ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY
WOODS HOLL
LIBRARY

SCEAUX — IMPRIMERIE E. CHARAIRE

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. Dr **CALMETTE** (A.), directeur de l'Institut Pasteur de Lille;
CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur;
Dr **GRANCHER**, professeur à la Faculté de médecine;
METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur;
NOCARD, professeur à l'École vétérinaire d'Alfort;
Dr **ROUX**, sous-directeur de l'Institut Pasteur;
Dr **VAILLARD**, professeur au Val-de-Grâce.

TOME QUINZIÈME

1901

AVEC QUATORZE PLANCHES

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

M381 (1)

15me ANNÉE JANVIER 1901 N° 1

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA SÉROTHÉRAPIE DE LA SEPTICÉMIE GANGRENEUSE

PAR MM.

E. LECLAINCHE
Professeur à l'Ecole vétérinaire de Toulouse.

ET

CH. MOREL
Agrégé à la Faculté de médecine de Toulouse.

Les seuls résultats concernant la sérothérapie de l'infection septique ont été publiés par Leclainche, en 1898. Un âne, traité par des inoculations intra-veineuses et sous-cutanées de sérosités provenant d'animaux tués par le vibrion septique, donne un sérum immunisant. L'immunisation préventive est facilement obtenue, chez le cobaye et chez le lapin, par l'injection de 5 c. c. de sérum. L'inoculation d'un mélange sérum-virus ne tue pas les animaux, mais elle ne leur confère pas d'immunité durable. Les propriétés curatives du sérum sont appréciables seulement lors d'évolution ralentie : chez le lapin, on peut enrayer les effets d'une inoculation virulente sûrement mortelle par une injection de sérum pratiquée plusieurs heures après l'insertion virulente [1].

Nous avons poursuivi, dans ces dernières années, l'étude de la sérothérapie de l'infection septique et nous apportons ici le résultat de nos recherches.

I

ACTION DES SÉRUMS NORMAUX SUR LE VIBRION SEPTIQUE

En règle générale, le sérum des *solipèdes* ne possède aucune propriété immunisante. Le sérum de l'âne qui a servi dans nos expériences s'est montré pleinement indifférent.

1. E. Leclainche, La sérothérapie de la gangrène gazeuse. *Archives médicales de Toulouse*, 1898, p. 397.

Exp. — Un cobaye qui reçoit, pendant 3 jours consécutifs, 5 c. c. de sérum, sous la peau du cou, est inoculé le quatrième jour, en même temps qu'un témoin, avec deux gouttes de sérosité virulente; les deux sujets succombent en 15 heures, avec des accidents locaux considérables.

Un cobaye qui reçoit un mélange de sérum (5 c. c.) et de sérosité virulente (2 gouttes) meurt en même temps que les précédents.

On rencontre cependant des solipèdes qui donnent un sérum doué de propriétés préventives. Un vieux cheval, n'ayant subi aucune préparation préalable, nous fournit un sérum capable de neutraliser, par mélange, les effets d'une culture virulente. Les cobayes qui reçoivent, sous la peau de la cuisse, une dilution de 1 goutte de culture dans 1 c. c. de sérum survivent dans toutes les expériences, alors que les témoins meurent en 12 heures environ. Les propriétés du sérum ne sont plus constatées alors qu'on l'injecte préventivement, à des doses de 5 et 10 c. c.; les cobayes traités, inoculés 24 heures plus tard avec une goutte de culture, succombent en même temps que les témoins.

Ainsi, le sérum d'un cheval non traité peut être doué de faibles propriétés immunisantes. Cette action n'est d'ailleurs constatée qu'exceptionnellement : les sérums provenant de quatre autres chevaux, dont trois très âgés, inoculés préventivement ou associés au virus, se sont montrés sans action à quelque dose que ce soit.

Le sérum des *bovidés*, animaux naturellement réfractaires au vibrion septique, se montre actif à l'état de mélange avec le virus. Les cobayes qui reçoivent, sous la peau de la cuisse, une goutte de virus diluée dans 5 à 1 c. c. de sérum survivent presque toujours, alors que les témoins sont tués en 12 heures environ. Par contre, l'injection préventive de 10 à 20 c. c. de sérum de bœuf ne modifie point les effets d'une inoculation virulente pratiquée 24 heures plus tard.

Le sérum de la *chèvre*, animal très sensible à l'infection septique, est dépourvu de toute propriété. Le mélange d'une goutte de culture, ou de deux gouttes de sérosité virulente, avec 10 ou 20 c. c. de sérum ne modifie point l'évolution. A plus forte raison, l'injection préventive du sérum reste toujours sans effet.

Il en est de même pour le sérum du *mouton*; mélangé, à la

dose de 5 c. c., à une ou deux gouttes de culture, il n'empêche point l'évolution virulente.

On voit que si les sérums normaux modifient en quelques cas les conditions de l'infection expérimentale, ils n'exercent qu'une action locale, toute différente de celle qui est consécutive à l'introduction d'un sérum doué de propriétés immunisantes spécifiques. Il est à remarquer aussi que le sérum fourni par une espèce réfractaire ou très résistante est le seul qui possède constamment des propriétés empêchantes, alors que le sérum fourni par les espèces sensibles est dépourvu de toute action.

II

PRODUCTION D'UN SÉRUM IMMUNISANT

A défaut du cheval, l'âne convient bien pour l'obtention d'un sérum immunisant.

Les injections intra-veineuses de faibles doses de virus ne provoquent aucun accident et elles confèrent l'immunité. Une première inoculation, dans la jugulaire, avec 5 c. c. d'une dilution de sérosité et de jus de muscles virulents provenant du cobaye ne détermine aucune réaction. L'animal supporte également, sans réagir, quatre ou six jours plus tard, des injections de 60 et 80 c. c. d'une dilution virulente obtenue avec les muscles d'une chèvre, tuée en dix heures par une inoculation intra-veineuse[1].

Le sérum de l'âne traité acquiert très vite des propriétés immunisantes appréciables. Au douzième jour de l'expérience, alors que l'animal a reçu dans la jugulaire 140 c. c. de dilution virulente, le sérum mélangé à la sérosité septique en neutralise les effets.

Exp. — Deux cobayes reçoivent des mélanges de 2 c. c. et 1 c. c. de sérum avec 6 gouttes de sérosité virulente; ils ne présentent aucun accident. Un témoin qui reçoit la même dose de virus, dilué dans 2 c. c. d'eau bouillie, est tué en moins de 16 heures.

Les cobayes qui reçoivent préventivement 5 c. c. de sérum, sous la peau du cou, ne sont nullement protégés contre une insertion virulente pratiquée 24 ou 48 heures plus tard.

1. Dans toutes les expériences, les « dilutions virulentes » sont obtenues par le mélange de sérosités et de jus de muscles virulents avec un volume égal d'eau stérilisée.

L'injection simultanée, en des régions différentes, du sérum et du virus ne modifie en rien l'évolution.

L'âne immunisé par les inoculations intra-veineuses virulentes est soumis successivement à trois séries d'inoculations, pratiquées dans le but d'obtenir un sérum fortement immunisant et de déterminer les conditions les plus favorables à sa production. Dans une première série, on emploie les inoculations sous-cutanées de sérosités virulentes; dans une seconde, l'animal reçoit des injections intra-veineuses de cultures en sang; enfin, dans une troisième, il est soumis à des injections, dans les veines, de cultures en bouillon.

Première Série. — *Inoculations sous-cutanées.* — L'âne reçoit des dilutions obtenues avec des muscles broyés, prélevés dans la région d'inoculation chez des animaux (cobaye, chèvre, pigeon, lapin) tués par le vibrion. Du 10 février au 1er mars 1898, l'animal reçoit des doses croissantes de liquides qui tuent le cobaye à la dose de 1 goutte et le cheval à la dose de 1 c. c.

L'état des inoculations pratiquées est résumé ci-après :

Jour de l'expérience.	Matière virulente injectée.
1er	1 c. c.
5e	2 —
10e	5 —
15e	15 —
30e	15 —
45e	15 —

Les inoculations provoquent des accidents notables. Après douze heures, on constate un engorgement douloureux, œdémateux, étendu à toute la région; la température reste normale; l'appétit est conservé. L'état s'aggrave pendant 24-48 heures; la tumeur devient emphysémateuse, crépitante; on note des frissons et de l'abattement; la température s'élève (de 37,5 à 38°, chiffre normal) à 40° et 40°5. Vers le troisième jour, un point de fluctuation est appréciable au niveau de la tumeur; si l'on n'ouvre pas prématurément le foyer, l'infiltration gazeuse décolle la peau et les plans musculaires, tandis que la région est infiltrée par le pus. Pour une même dose de matière virulente, l'intensité des réactions locale et générale diminue lors d'une inoculation nouvelle, pour devenir insignifiante à la troisième.

Le sérum de l'âne acquiert des propriétés remarquables à la suite des premières injections sous-cutanées. Le sérum

recueilli le 15e et le 30e jour neutralise, par mélange, à la dose de 1 c. c., la dose certainement mortelle pour le cobaye de sérosité virulente; de plus, l'injection préventive de 10 et 5 c. c. de sérum protège sûrement le cobaye contre une inoculation virulente pratiquée 24 heures plus tard.

Toutefois, le pouvoir du sérum ne subit plus aucun accroissement dès que les tissus ne réagissent plus aux inoculations, il diminue progressivement malgré deux inoculations massives de dilutions virulentes. Le sérum recueilli dix jours après la dernière inoculation est incapable d'immuniser préventivement le cobaye à la dose de 10 c. c.; il neutralise seulement la sérosité virulente à la dose de 1 c. c.; ses propriétés sont sensiblement égales à celles qui étaient constatées à la suite des injections intra-veineuses. On peut conclure déjà que les inoculations sous-cutanées conviennent mal à l'obtention indéfinie d'un sérum immunisant, alors que la voie intra-veineuse paraît très favorable.

Deuxième série. — *Inoculations intra-veineuses de cultures en sang.* — Le développement du vibrion septique s'opère très bien dans le sang, en l'absence de l'oxygène. *A priori*, on pouvait espérer obtenir dans ce milieu des toxines analogues à celles qui sont élaborées dans les organismes infectés.

Nous avons adopté pour la culture la technique suivante. On aspire dans un ballon Chamberland quelques gouttes d'une culture de vibrion ou de sang septique. On pratique ensuite, sur un cheval, une saignée au trocart, suivant le procédé usité pour la récolte des sérums; le sang est recueilli dans un grand verre à réactif, bouché au papier. Dès que le sang arrive dans le verre on plonge l'effilure du ballon préalablement ensemencé au fond du vase, en traversant le papier qui le recouvre. On aspire le sang au fur et à mesure de son arrivée de telle façon que le ballon soit rempli aux deux tiers environ. Il est facile de régler l'arrivée du sang dans le verre par la simple pression des doigts sur le tube de caoutchouc. On mélange, par agitation, le contenu du ballon; on soude l'effilure et on soumet à l'action de la trompe, en ayant soin de laver par quelques passages d'hydrogène ou de gaz d'éclairage purifié.

La culture s'opère rapidement : elle est dénoncée par l'aspect spongieux du caillot dissocié par des gaz, puis par la liqué-

faction du milieu. Après huit ou dix jours, le sang est transformé en une boue liquide de couleur noire. La liquéfaction est assez complète pour que l'on puisse recueillir par l'effilure la presque totalité du contenu.

Les cultures ainsi obtenues sont très virulentes; elles tuent le cobaye, à la dose de 1 goutte, en 10 heures environ.

L'âne qui a servi dans les expériences précédentes, laissé au repos depuis quatorze mois, est mis en traitement le 9 juin 1899. Il reçoit, dans la jugulaire, des injections de cultures diluées avec leur volume d'eau bouillie.

L'ordre des inoculations est indiqué ci-après :

Jour de l'expérience.	Quantité de culture injectée.	Jour de l'expérience.	Quantité de culture injectée.
1er	20 c. c.	22e	30 c. c.
5e	15 —	36e	50 —
10e	50 —	43e	50 —
15e	50 —	63e	50 —

Au total, 315 c. c. de culture.

Les injections ne provoquent aucun accident, immédiat ou consécutif. Le pouvoir immunisant du sérum, nul au début du traitement, se relève dès les premières injections; toutefois il n'augmente que lentement ensuite et il ne dépasse pas le degré constaté à la suite des inoculations sous-cutanées par les jus virulents. On peut inoculer impunément, au cobaye, au lapin et au pigeon, une dose sûrement mortelle de virus, alors que celui-ci est mélangé avec 1 c. c. de sérum; d'autre part, une injection de 5 c. c. de sérum immunise le cobaye contre une inoculation virulente pratiquée 12-24 heures plus tard.

Troisième série. — *Inoculations intra-veineuses de cultures en bouillon.* — L'âne est laissé au repos du 10 août 1899 au 19 février 1900. A ce moment, son sérum est impuissant à protéger préventivement, à des doses de 10 et 15 c. c., contre la dose mortelle minima du virus; mélangé au virus, il protège encore à la dose de 5 c. c.

Dans cette série d'inoculations, l'âne reçoit des cultures opérées dans du bouillon préparé suivant la technique de Martin, avec la macération de viande et l'estomac de porc, neutralisé et filtré sur porcelaine.

Le développement est rapide dans ce milieu; après douze heures, le liquide est uniformément trouble; il laisse dégager

de nombreuses bulles gazeuses. Vers le troisième ou le quatrième jour, le bouillon s'éclaircit : le dégagement gazeux cesse et il s'opère, dans le fond du vase, un dépôt sédimenteux blanchâtre.

La culture est très active ; elle tue le cobaye en 15-18 heures, à la dose d'une goutte.

L'âne reçoit, dans la jugulaire, une série d'injections : les conditions de l'expérience sont résumées ci-après :

Jour de l'expérience.	Quantité de la culture injectée.	Age de la culture.
1er	20 c. c.	5 jours.
19e	50 —	10 —
25e	40 —	8 —
40e	60 —	4 —
51e	50 —	5 —
58e	85 —	10 —
70e	65 —	6 —
78e	45 —	8 —
90e	65 —	5 —
101e	80 —	5 —

Au total, 560 c. c. de culture.

Les premières injections ne provoquent pas d'accidents immédiats ; mais elles occasionnent des troubles généraux (inappétence, faiblesse, amaigrissement) qui nécessitent chaque fois un repos assez long. Les trois dernières inoculations sont suivies, quelques minutes après la pénétration, d'agitation et de coliques, avec évacuations de matières diarrhéiques et sudation extrêmement abondante.

Les propriétés immunisantes du sérum augmentent régulièrement au cours du traitement ; à la fin de l'expérience, le sérum recueilli se montre beaucoup plus actif que celui qui avait été obtenu avec les autres procédés employés. Les inoculations intra-veineuses de cultures en bouillon Martin, à l'âne ou au cheval, nous paraissent constituer la méthode de choix pour l'obtention d'un sérum immunisant.

III

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DU SÉRUM IMMUNISANT

Nous étudierons successivement : les propriétés préventives du sérum, les effets de l'inoculation simultanée du sérum et du virus, ceux de l'inoculation du mélange sérum-virus, et enfin l'action curative du sérum.

a) Action préventive du sérum. — L'immunisation préventive est facilement réalisée chez le cobaye, le lapin et le pigeon, par l'injection sous-cutanée de faibles doses de sérum. L'état réfractaire est complet 24 heures après la pénétration du sérum; il persiste pendant cinq ou six jours, pour diminuer rapidement ensuite. L'immunité conférée est très solide; elle permet aux animaux les plus sensibles de résister à l'inoculation d'une quantité de virus double ou quadruple de la dose certainement mortelle.

Exp. — Cob. 55, 56 et 57 reçoivent, sous la peau du cou, 10 c. c. de sérum. 24 heures plus tard, ils sont inoculés, dans la cuisse, avec une goutte de sang septique dilué. Tous restent indemnes, alors qu'un cobaye témoin succombe en 18 heures.

Cob. 246, 247 et 248 reçoivent respectivement 2, 1 et 1/2 c. c. de sérum. Vingt-quatre heures après, tous sont inoculés, dans la cuisse, avec deux gouttes de culture virulente, en même temps que deux témoins qui succombent en 30 heures. Tous restent indemnes.

Chez les animaux solidement immunisés à l'égard d'une dose donnée de virus, on ne constate aucune réaction locale à la suite de l'inoculation virulente; alors que l'on atteint la limite de la résistance, — soit que l'animal n'ait reçu qu'une dose faible de sérum, soit que l'on augmente la quantité de virus inoculé — on note un œdème chaud, plus ou moins étendu, au point d'inoculation.

Le dépôt du sérum dans le péritoine a les mêmes effets préventifs que l'inoculation sous-cutanée :

Exp. — Cob. 338 et 339 reçoivent, dans le péritoine, 5 et 2 c. c. de sérum. Le lendemain, ils sont inoculés, sous la peau de la cuisse, en même temps que deux témoins, avec 4 gouttes de sérosité virulente. Les témoins meurent en 15 et 18 heures; les traités restent indemnes.

L'injection du sérum dans les veines est également protectrice :

Exp. — Lapins 274 et 275 reçoivent, dans la veine de l'oreille, 1 et 2 c. c. de sérum. 24 heures plus tard, ils sont inoculés, dans les muscles de la cuisse, avec 4 gouttes de culture. Ils restent indemnes, alors que deux témoins succombent en 24 et 28 heures.

b) Inoculation simultanée du sérum et du virus. — L'inocu-

lation simultanée, en des points différents, du sérum et du virus est impuissante à assurer la protection des animaux très sensibles, comme le cobaye.

Exp. — Cob. 335 et 337 reçoivent en même temps 5 c. c. et 2 c. c. de sérum, sous la peau du cou, et 4 gouttes de sérosité virulente dans la cuisse. Cob. 334 et 336 reçoivent en même temps l'un 5 c. c. et l'autre 2 c. c. de sérum dans le péritoine, et 4 gouttes de sérosité virulente dans la cuisse.

Les quatre cobayes succombent en 12-14 heures, en même temps que deux témoins qui ont reçu la même dose de virus.

Le résultat est identique alors que les inoculations de virus et de sérum sont pratiquées dans une même région.

Exp. — Cobayes 252 et 253 reçoivent, dans les muscles de la cuisse, 2 gouttes de culture. Aussitôt après, on injecte dans la même région, et autant que possible au même point, 4 et 3 c. c. d'un sérum qui protège, par mélange, à la dose de 1 c. c., contre une même quantité de virus.

Les deux cobayes succombent en 10 et 15 heures et le cobaye témoin en 17 heures.

c) Inoculation du mélange sérum-virus. — Tandis que les animaux succombent à coup sûr à l'inoculation simultanée de quantités données de sérum d'une part et de virus d'autre part, ils résistent toujours si l'on injecte le mélange du sérum avec le virus. Bien plus, on peut, dans ces conditions, réduire à la moitié ou au quart la quantité de sérum, ou encore doubler et quadrupler la dose du virus, sans modifier les résultats de l'épreuve.

Exp. — Cob. 359 et 360 reçoivent, dans les muscles de la cuisse, un mélange de 2 c. c. de sérum avec 2 gouttes de sérosité virulente provenant d'un lapin tué en 36 heures.

Cobayes 361 et 362 reçoivent la même dose de virus, associée à 1 c. c. de sérum. Tous quatre restent indemnes; deux témoins, inoculés avec la même dose de virus pur, meurent en 12 et 15 heures avec des lésions considérables.

Lapins 354 et 355 reçoivent, dans la cuisse, 4 gouttes de la sérosité employée dans l'expérience précédente, mélangée avec 1 c. c. de sérum pour l'un et 1/2 c. c. pour l'autre. Ils restent indemnes ; le témoin succombe en moins de 36 heures.

Il s'en faut cependant que, pour une même dose de virus, l'innocuité de l'épreuve soit exactement fonction de la quantité de sérum employé. Il arrive qu'une dose faible de sérum assure la protection, alors que des doses doubles n'empêchent point

l'évolution Il existe, pour une quantité donnée d'un virus, une dose neutralisante optima; nous avons relevé déjà cette curieuse particularité de l'action des mélanges sérum-virus pour le rouget du porc et le charbon symptomatique. Voici, en ce qui concerne le vibrion septique, le relevé d'une de nos séries d'expériences.

Exp. — Cobayes 330, 331 et 332 reçoivent respectivement 5, 3 et 2 c. c. de sérum mélangé avec 4 gouttes de sérosité virulente. Un témoin, qui reçoit le virus seul, est tué en moins de 19 heures. Les cobayes 331 et 332 (3 et 2 c. c. de sérum) restent complètement indemnes; le cobaye 330 (5 c. c.) succombe, avec un engorgement considérable, après 24 heures, c'est-à-dire avec un léger retard sur le témoin.

Si la dose de virus est très élevée, la protection n'est plus assurée, même si l'on emploie le sérum à dose massive. Si la dose de sérum est insuffisante, les sujets succombent en même temps que les témoins ou avec des retards plus ou moins marqués dans l'évolution.

Exp. — Les cobayes 344, 345 et 346 reçoivent respectivement 2 c. c., 1 c. c. et 1/2 c. c. de sérum mélangé à une dose constante de virus (5 gouttes de sérosité). Le témoin est tué en 11 heures; le cobaye 344 (2 c. c.) résiste et l'on ne constate qu'un léger engorgement local; le cobaye 345 (1 c. c.) présente, après 12 heures, une tuméfaction étendue, et il succombe en 21 heures; le cobaye 346 (1/2 c. c.) ne montre que des lésions locales peu étendues, mais il entre en hypothermie et meurt septique en 32 heures environ.

Les cobayes qui ont reçu le mélange sérum-virus ne possèdent aucune immunité consécutive. Inoculés 10, 20, 30 jours plus tard, avec la dose mortelle minima, ils succombent aussi sûrement et aussi rapidement que les témoins. Ce fait, mis en lumière et interprété par l'un de nous en 1898, était opposé dès ce moment à l'exemple fourni par le rouget du porc, pour lequel une immunisation durable est facilement réalisée. Kitt a constaté depuis, pour une infection toute voisine de la septicémie gangreneuse, le charbon symptomatique, l'inefficacité des mélanges sérum-virus pour obtenir l'état réfractaire.

d) Sérothérapie curative. — Ainsi qu'on peut le prévoir d'après les résultats de l'inoculation simultanée, en des points différents, du sérum et du virus, la sérothérapie curative ne peut donner aucun résultat chez le cobaye.

L'évolution très rapide de la septicémie vibrionienne ne permet point à l'imprégnation protectrice de s'opérer en temps utile. On ne constate même aucun retard dans l'évolution : les cobayes traités succombent en même temps ou plus vite que les témoins.

Il en est autrement lors d'évolution retardée, soit que l'on opère avec un virus faible, soit que l'on intervienne chez des sujets plus résistants. Chez le lapin, l'évolution de l'infection septique est moins rapide que chez le cobaye, et l'inoculation simultanée, en des points différents, du sérum et du virus, ne tue que tout à fait exceptionnellement.

Exp. — Cinq lapins (280 à 284) reçoivent, dans la cuisse, 5 gouttes d'une dilution de muscles virulents et, aussitôt après, 10, 8, 6, 5 et 4 c. c. de sérum sous la peau du cou. Tous restent indemnes, à l'exception du 283 (ayant reçu 6 c. c. de sérum) qui meurt septique en 26 heures, en même temps que le témoin.

Les injections pratiquées dans les quelques heures qui suivent une insertion virulente sévère n'assurent qu'une survie plus ou moins longue.

Exp. — Quatre lapins, 355 à 358, reçoivent chacun 4 gouttes d'une dilution de muscles virulents, en même temps qu'un témoin qui succombe en 36 heures. Le 355 reçoit, aussitôt après l'inoculation virulente, 4 c. c. de sérum sous la peau du cou; il reste indemne. Le 356 reçoit le sérum après 2 heures; on le trouve malade dès le lendemain ; il meurt, très amaigri, le cinquième jour. Pas de lésions locales. L'ensemencement du sang reste stérile. Le 357, traité après 5 heures, meurt le sixième jour, aussi très amaigri. Le 358, traité après 7 heures, meurt en 18 heures environ, soit 18 heures avant le témoin.

Les résultats de l'intervention sont plus favorables si l'on opère avec des doses moindres ou avec un virus moins actif. L'un des vibrions qui nous ont servi, très virulent pour le cobaye qu'il tue en 10-15 heures, ne tue le lapin qu'en 60-72 heures. En ces conditions, l'action du sérum est plus nettement appréciable.

Le tableau suivant résume les résultats de trois séries d'expériences. Les lapins reçoivent dans tous les cas, sous la peau de la cuisse, une dilution obtenue avec les muscles virulents du cobaye ; le sérum est injecté, après des temps variables, sous la peau du cou.

Lapins.	Matière virulente injectée.	Traités après:	Sérum injecté.	*Résultat.*
134	4 gouttes.	1 heure.	10 c. c.	Survit.
136	—	5 heures.	—	Mort en 12 jours.
137	—	8 —	—	Mort en 6 jours.
138	—	*Témoin.*	—	Mort en 60 heures.
221	6 gouttes.	2 heures.	6 c. c.	Mort en 6 jours.
222	—	8 —	—	Mort en 60 heures.
226	—	*Témoin.*	—	Mort en 70 heures environ.
291	4 gouttes.	1 heure.	4 c. c.	Survit.
292	—	3 heures.	—	Mort en 6 jours.
295	—	5 —	—	Mort en 60 heures.
296	—	11 —	—	Mort en 67 heures.
293	—	*Témoin.*	—	Mort en 58 heures environ.

Le résultat du traitement est d'autant plus certain que l'on intervient plus hâtivement; dès la deuxième heure après l'infection, l'on n'est plus assuré d'enrayer l'évolution de la septicémie chez le lapin. L'injection du sérum dans le péritoine ou dans les veines ne paraît pas augmenter sensiblement les délais.

Il est permis de penser que la sérothérapie préventive donnerait, chez les grands animaux et chez l'homme, des résultats semblables à ceux qui sont constamment obtenus chez les petits animaux contre les modes les plus sévères de l'infection expérimentale. Le traitement serait indiqué dans les cas de plaies contuses profondes, souillées par la terre, le fumier, la boue ou la poussière des rues, surtout alors qu'elles siègent dans des régions riches en tissu conjonctif.

On peut prévoir que la sérothérapie curative serait possible, dans la plupart des cas, chez le cheval et chez l'homme. Chez eux, l'évolution habituelle est relativement lente si on la compare à celle de la maladie expérimentale du cobaye ou du lapin, dont la réceptivité est certainement plus grande.

Le sérum produit par nous s'est montré également actif contre des virus de provenance différente. Nous avons obtenu des effets identiques avec trois types différents, dont deux d'origine saprogène : l'un, entretenu depuis plusieurs années dans le laboratoire, provenait du cadavre d'un lapin, l'autre du cadavre d'un cheval. Le troisième vibrion employé avait été isolé d'une gangrène gazeuse du bras chez l'homme.

Le sérum recueilli et conservé avec les précautions usuelles garde longtemps ses propriétés : après sept mois, il possède toute son activité.

IV

PROPRIÉTÉS ET MODE D'ACTION DU SÉRUM

Il résulte des faits expérimentaux rapportés qu'il est possible d'obtenir un sérum capable d'immuniser préventivement des animaux très sensibles à l'infection septique et d'enrayer, sous certaines conditions, les effets d'une inoculation virulente antérieure ou simultanée.

Certaines constatations tendent à préciser le mode d'action du sérum. On a vu ainsi que, pour des doses égales d'un même sérum et d'un même virus, les conséquences sont toutes différentes suivant que l'on mélange ou non le virus au sérum. Alors que le sérum est injecté dans la région qui a reçu le virus, la prévention n'est encore point assurée chez des sujets très sensibles, comme le cobaye.

Exp. — Cobayes 321 et 322 reçoivent, dans la cuisse, le mélange de 1/4 c. c. d'une culture en bouillon et de 1/4 c. c. de sérum. Tous deux restent indemnes, alors que le témoin succombe en 17 heures. — Cobaye 325 reçoit en même temps 1/4 c. c. de culture dans la cuisse droite et 2 c. c. de sérum dans la cuisse gauche. Mort en 16 heures. — Cobaye 326 reçoit 1/4 c. c. dans la cuisse gauche et, aussitôt après, 2 c. c. de sérum dans la même région. Mort en 13 heures.

En outre de l'action générale constatée lors d'immunisation préventive, le sérum exerce donc une action protectrice locale lorsqu'il est associé au virus. Dans ces conditions, il nous a paru intéressant d'étudier les effets du sérum sur la toxine septique et sur la phagocytose.

Les premiers résultats de Leclainche (1898) montraient déjà que les sérosités septiques, filtrées suivant le procédé de Roux et Chamberland, perdent leurs propriétés toxiques si on les associe à un volume égal ou à un demi-volume de sérum. Le mélange, injecté à la température de 38°, dans le péritoine du cobaye, ne produit plus aucun accident d'intoxication ; les fortes doses provoquent seulement quelques hoquets et des manifestations sans gravité, identiques à celles qui sont observées lors de l'injection du sérum pur.

On constate les mêmes faits si l'on opère avec des cultures en sang. Alors que le filtrat provoque des accidents graves

presque immédiats (coma, hérissement des poils, hypothermie, le mélange sérum-filtrat ne détermine que des troubles légers.

Exp. — Cobaye 508 reçoit une 3e culture en sang, âgée de 12 jours, filtrée sous pression de 4 à 5 atmosphères, après mélange avec un volume égal d'eau bouillie. On injecte dans le péritoine 5 c. c. du filtrat, soit 2 c. c. 1/2 de culture. Après 2 heures, abattement, hypothermie, puis coma; mort après 24 heures.

Cobaye 509 reçoit le même filtrat à la dose de 5 c. c., mélangé à 5 c. c. de sérum. Aucun accident.

Les températures relevées sont les suivantes :

		Température initiale.	Après 2 h.	4 h.	6 h.	8 h.	9 h.	24 heures.	
508.	Toxine.....	38	33.2	31.5	32	33.7	37.3	37.2	mort.
509.	Toxine-sérum..	38.2	37	37.5	38.4	»	»	39.2	

La culture en bouillon Martin est également toxique; mais alors que les sérosités et les cultures en sang diluées conservent généralement une partie au moins de leur toxicité, la culture en bouillon perd toute activité après avoir traversé le filtre Chamberland. Nous avons employé les bougies F, avec ou sans pression, sans pouvoir obtenir un filtrat toxique.

La rapidité avec laquelle apparaissent les phénomènes d'intoxication permet heureusement de recourir pour l'épreuve aux cultures non filtrées. Nous nous servons de préférence du bouillon décanté de cultures âgées de 10 à 20 jours, opérées dans des pipettes à boules; le liquide renferme très peu d'éléments virulents; les spores déposées restant dans l'effilure de la pipette.

L'inoculation intra-veineuse, au lapin, de 5 c. c. de culture provoque des accidents immédiats. Après quelques minutes, l'animal est pris de convulsions; il cherche à fuir, puis il tombe sur le côté, avec de l'exorbitisme, de la dyspnée et un ralentissement progressif des pulsations cardiaques. La mort arrive après 10-60 minutes.

L'injection dans le cerveau de 5-6 gouttes de culture provoque, après 7-8 minutes, des troubles étendus : agitation, exorbitisme, chute, contractions rythmiques des membres antérieurs, puis de tous les muscles; mort après 2 heures en moyenne.

Le dépôt de la culture dans le péritoine du cobaye est suivi de stupéfaction, avec hypothermie progressive; le ventre est douloureux et ballonné; la mort arrive, dans le coma, après quelques heures, alors que la température est descendue au-dessous de 30°.

Il existe des lésions locales constantes. Alors que l'autopsie est faite aussitôt après la mort, on trouve le péritoine fortement congestionné; la cavité renferme une sérosité rosée abondante; l'intestin, hyperémié, contient des matières diarrhéiques; le foie est décoloré et friable. L'examen de l'exsudat péritonéal, pratiqué au moment de la mort, chez des cobayes ayant succombé en trois heures environ, montre de nombreuses cellules endothéliales desquammées, isolées ou réunies en larges lambeaux; les leucocytes sont extrêmement rares ou manquent tout à fait; on retrouve des vibrions en abondance.

Au contraire, l'inoculation dans le péritoine du mélange sérum-virus ne produit plus aucun accident. Les cobayes qui reçoivent 5 c. c. de culture associée à 2 c. c. 1/2 de sérum ne présentent aucun trouble consécutif. Si l'on prélève, avec une pipette, une goutte du contenu péritonéal après 3 heures, c'est-à-dire à la période correspondant à la mort des témoins, on constate une phagocytose intense. L'exsudat est opalin; il renferme de très nombreux leucocytes, gros mononucléaires et polynucléaires; on ne trouve point de cellules endothéliales; il ne s'est opéré aucune germination des spores introduites.

Exp. — Cobayes 322 et 323 reçoivent, dans le péritoine, 5 c. c. d'une culture décantée en bouillon Martin âgée de 10 jours. Cobayes 324 et 325 reçoivent chacun 5 c. c. du même liquide, mélangé à 2 c. c. 1/2 de sérum.

Quelques minutes après l'injection, les cobayes 322 et 323 sont inquiets; le poil se hérisse; des secousses convulsives agitent les membres. Après 20 à 25 minutes, l'abdomen est tendu, douloureux. Des paralysies surviennent débutant par les membres postérieurs. L'hypothermie est très marquée. Le cobaye 322 meurt après 1 heure et le 323 après 3 heures. L'autopsie montre de la congestion de l'intestin; dans le péritoine, un exsudat liquide assez abondant renferme des cellules endothéliales, isolées ou réunies en blocs.

Les cobayes 324 et 325 ne présentent aucun accident. L'exsudat péritonéal, examiné 1 heure et 3 heures après l'inoculation, renferme de nombreux leucocytes, sans cellules endothéliales.

Les températures relevées sont les suivantes :

I. CULTURE PURE.

	Température initiale.	Après 1 h.	2 h.	3 h.	4 heures.
	—	—	—	—	—
Cob. 322.	37.8	35.2	Mort		»
— 323.	39	35.1	32.4	28 Mort	»

II. CULTURE ET SÉRUM

Cob. 324.	38.3	39.2	39.5	39.5	39.6 survit.
— 325.	38.6	39.1	39.1	39.3	39.6 —

L'expérience précédente montre que le sérum possède un pouvoir antitoxique très net. L'action antitoxique est encore constatée si le sérum est injecté préventivement :

Exp. — Cobayes 401 et 402 sont inoculés, l'un avec 5 c. c., l'autre avec 10 c. c. de sérum, sous la peau du cou. Vingt-quatre heures plus tard, ils reçoivent dans le péritoine, en même temps qu'un témoin, 5 c. c. d'une culture en bouillon Martin âgée de 8 jours.

Les deux cobayes traités ne présentent aucun accident. Le témoin montre les troubles habituels (stupéfaction, hérissement des poils, hypothermie progressive) et il succombe après 6 heures.

Les températures relevées sont les suivantes :

	Température initiale.	Après 1 h.	2 h.	5 h.	12 heures
	—	—	—	—	—
Cob. 401.	38.6	38	37.9	37.5	39 survit.
— 402.	38	38	38.2	38.4	38.8 —
Témoin..	37.5	34.7	31	30 mort	

Ainsi l'action antitoxique exercée est indépendante d'une altération de la toxine au contact du sérum : elle doit être rapportée à une modification de l'organisme devenu réfractaire.

En résumé :

1. Il est possible d'obtenir un sérum immunisant contre le vibrion septique. Le procédé de choix consiste en des inoculations intra-veineuses en série, chez les solipèdes, avec des cultures du vibrion en bouillon Martin;

2. Le sérum obtenu possède des propriétés préventives et, sous certaines conditions, un pouvoir curatif. Les inoculations du mélange sérum-virus sont inoffensives, mais elles ne confèrent pas d'immunité durable;

3. Le sérum exerce une action à la fois antimicrobienne et antitoxique. La protection est liée à l'action favorisante exercée sur la phagocytose.

SÉRUM NÉPHROTOXIQUE

PAR LE Dr NICOLAS NÉFÉDIEFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

M. Metchnikoff (1) propose le nom de *cytotoxines* pour désigner les poisons d'origine animale qui possèdent la propriété de frapper les cellules de l'organisme. On sait depuis longtemps que chez certains animaux à l'état normal, existent des substances qui deviennent toxiques pour certaines cellules des animaux d'autres espèces. Mais c'est tout récemment qu'on a démontré qu'il est possible de provoquer dans l'organisme l'apparition de ces cytotoxines par l'introduction de certains éléments cellulaires. Ainsi Bordet (2), Ehrlich et Morgenroth (3), Düngern (4), démontrerent que le sérum du sang des animaux auxquels on avait injecté du sang d'une autre espèce d'animal, acquiert la propriété de détruire les globules rouges du sang des animaux de cette dernière espèce, c'est-à-dire que dans le sang de l'animal injecté se développe une *hémotoxine*.

M. Metchnikoff (5) a obtenu une *leucotoxine* et une *spermotoxine*. Cette dernière a été aussi décrite par Lansteiner (6) et par Métalnikoff (7).

Düngern (8) a obtenu une toxine qui arrête les mouvements des cils vibratiles des cellules épithéliales de la trachée.

La préparation des cytotoxines artificielles nuisibles aux cellules facilement isolables paraît ne pas présenter de grandes difficultés. Tous les auteurs qui ont fait des recherches sur ce sujet arrivent à des résultats identiques.

Toute autre est la question de la préparation de la cytotoxine artificielle, nuisible aux cellules spécifiques de certains organes, cellules qu'il est presque impossible d'isoler, comme par exemple celles de l'épithélium rénal ou les cellules hépatiques. Aussi les résultats des recherches sur ce sujet sont-ils contradictoires. Ainsi, Lindemann (9) dit avoir réussi à préparer en

injectant aux cobayes une émulsion de reins des lapins, un sérum néphrotoxique actif. Schültze (10), au contraire, n'a pas pu observer l'effet néphrotoxique du sérum des lapins auxquels il avait injecté une émulsion de rein de cobaye.

Il n'a pas pu non plus constater l'effet hépatolytique des sérums des animaux auxquels on avait injecté de l'émulsion du foie, tandis que Delezenne (11) et Deutsch affirment que les animaux auxquels on injecte l'émulsion du foie fournissent un sérum qui possède des propriétés hépatotoxiques nettement manifestes.

Vu ces contradictions, il était de tout intérêt de continuer l'étude de ces questions. C'est pourquoi je me suis proposé de publier mes recherches sur le sérum néphrotoxique.

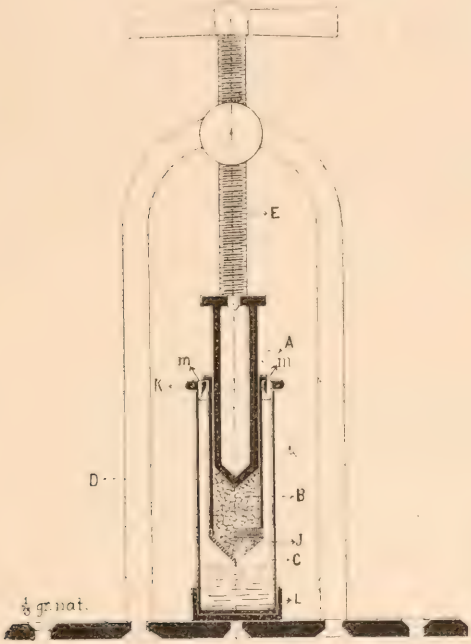
Je faisais mes expériences sur des lapins et des cobayes. J'injectais à des lapins de 2 c. c. à 5 c. c. de l'émulsion de rein de cobaye. Pour chaque injection, je préparais l'émulsion avec un ou deux reins. Aux cobayes je faisais trois injections hypodermiques d'émulsion de reins de lapins. Pour la préparation de l'émulsion, j'employais 1/4 de rein de lapin pour chaque injection. Les intervalles entre les injections, pour les uns et pour les autres, étaient de huit à dix jours ; huit à dix jours aussi après la dernière injection, je prenais le sang de l'artère carotide, et j'injectais le sérum de ce sang aux animaux de l'espèce à laquelle j'avais pris les reins pour préparer l'émulsion. Quelques jours avant de commencer les injections, on plaçait les animaux en expérience dans une cage spéciale, disposée de telle façon qu'il m'était possible de recueillir toute l'urine que l'animal émettait dans les 24 heures. Tous les jours je faisais l'analyse des urines.

Telles furent, en peu de mots, mes expériences.

Mais avant d'exposer les résultats que j'ai obtenus, je crois utile de dire quelques mots sur le mode de préparation des émulsions rénales : ceci étant d'une très grande importance dans ces expériences. Étant donnée l'impossibilité de stériliser l'émulsion, car la stérilisation aurait, probablement, détruit les éléments spécifiques de l'organe intervenant dans l'immunisation, il fallait préparer l'émulsion aseptiquement.

Au début j'opérais de la façon suivante : avec toutes les précautions possibles, afin d'éviter l'infection, j'enlevais les

reins à l'animal qu'on venait de tuer et saigner à blanc ; après les avoir débarrassés de leur capsule, je les lavais soigneusement dans une solution physiologique de sel marin, je les plaçais ensuite dans un bocal stérile, et là, au moyen de ciseaux stérilisés, je les coupais en menus morceaux que je passais finalement à travers un tamis métallique très fin préalablement chauffé à blanc. L'émulsion ainsi préparée était en effet suffisam-



ment fine ; mais, malgré toutes les précautions, il était impossible d'avoir une émulsion parfaitement stérile. Et aussi tous les animaux, auxquels j'avais injecté l'émulsion ainsi préparée, ou bien mouraient, ou bien présentaient des abcès à la place même de l'injection. C'était là la raison pour laquelle au début tous mes animaux périssaient après la première ou la deuxième injection. C'est pendant la dernière manipulation, c'est-à-dire au moment du passage à travers le tamis métallique, que l'émul-

sion se contaminait, car pour faire bien passer deux reins de cobaye, il fallait au moins une demi-heure de travail, et la manipulation s'exécutait à ciel ouvert.

Afin d'éviter cet inconvénient j'ai fait préparer chez Collin, d'après mes indications, le petit appareil suivant.

Cet appareil constitue une sorte de presse.

Ainsi que le représente le dessin ci-joint, il est composé de trois cylindres qui s'emboîtent les uns dans les autres, et dont deux sont creux et le troisième est plein.

Le cylindre extérieur (C) sert de réservoir à l'émulsion à préparer. Dans la partie supérieure de ce cylindre s'adapte un disque (K) qui a deux ouvertures (m) pour le passage de l'air; ce disque sert en outre de support au deuxième cylindre (B). Ce cylindre moyen se termine en bas par un entonnoir (I) qui est fixé par une vis. Cet entonnoir est percé de trous extrêmement fins, leur diamètre ne dépasse pas celui de la plus fine aiguille de la seringue de Pravaz. La surface interne de l'entonnoir est râpeuse. Dans ce cylindre on place les morceaux de l'organe dont on veut préparer une émulsion.

Le troisième cylindre (A) est plein et se termine en forme de cône; il remplit entièrement le deuxième cylindre. En haut il se termine par une vis de pression (E) qui passe à travers le support (D). Les trois cylindres, pour plus de stabilité, sont placés en bas dans un étui (L). Toutes les parties s'adaptent hermétiquement. Les dimensions de l'appareil sont telles que lorsque le liquide remplit le cylindre extérieur jusqu'au sommet de l'entonnoir, le volume de ce liquide est égal à 15 c. c. Cet appareil est en cuivre nickelé : par conséquent, il peut être stérilisé à l'autoclave.

Dans toutes mes expériences, dont la description détaillée se trouve à la fin de cet article, je me suis servi de cet appareil pour la préparation de l'émulsion.

Cette préparation se faisait de la façon suivante : on versait dans le cylindre extérieur 15 c. c. de solution physiologique de sel marin, ensuite on stérilisait l'appareil à l'autoclave pendant une 1/2 heure sous la pression d'une atmosphère et demie. On laissait refroidir l'appareil, et on mettait dans le cylindre moyen des reins coupés en petits morceaux, enlevés aussi aseptiquement que possible à un animal saigné à blanc. Puis on

plaçait le cylindre (A), et au moyen de la vis à pression (E) on faisait passer dans le cylindre extérieur à travers l'entonnoir-tamis (I) tout le contenu du moyen cylindre. L'émulsion obtenue de cette façon était suffisamment liquide, les parcelles de l'organe très finement divisées, et le tout parfaitement stérile : à plusieurs reprises j'ai fait des cultures, et les résultats furent toujours négatifs.

Je passe maintenant à mes expériences.

Tout d'abord il faut noter ce fait, que le sérum des lapins auxquels on a injecté l'émulsion de reins de cobayes devient très toxique pour ces derniers, car une injection hypodermique de 10 c. c. de sérum par kil. d'animal est mortelle pour un cobaye.

Tous les cobayes, sauf un, sont tombés malades et sont morts quelques jours après avoir reçu cette dose de sérum en injection sous-cutanée. En outre, ce sérum manifeste non seulement un effet toxique général chez le cobaye, mais exerce encore, sur les reins de ces animaux, une action spéciale quoique assez faible. Cet effet néphrotoxique se traduisait dès le lendemain de l'injection, par l'apparition d'une petite quantité, presque des traces d'albumine dans les urines. Bien que l'albumine fût toujours en quantité insignifiante et n'augmentât que peu, sa présence dans les urines était pourtant constatée tout le temps jusqu'à la mort de l'animal.

Cette propriété néphrotoxique du sérum sanguin des lapins se manifestait dès la deuxième injection des reins de cobayes sains. Plus le nombre d'injections augmentait, plus cette propriété néphrotoxique devenait notable, sans devenir cependant très intense. Ainsi on ne constatait que des traces d'albumine dans les urines chez les cobayes auxquels on avait injecté du sérum de lapins n'ayant reçu que deux injections d'émulsion, tandis que le sérum des lapins, après quatre ou cinq injections d'émulsion, produisait chez les cobayes, à la même dose que dans le premier cas, une albuminurie notable.

D'autre part, les modifications anatomo-pathologiques des reins des animaux tués par le sérum néphrotoxique se trouvaient en parfaite corrélation avec la quantité d'albumine présente dans les urines.

Dans le premier cas, c'est-à-dire chez les cobayes morts à la

suite d'injection du sérum néphrotoxique faible, on constate, à l'examen microscopique des reins, des modifications insignifiantes, consistant principalement en une hyperémie des vaisseaux, des glomérules et des capillaires intercanaliculaires, en un gonflement des cellules du tissu conjonctif disposé entre les canalicules: quant à l'épithélium propre des reins, il avait l'aspect tout à fait normal, sauf un faible gonflement des cellules épithéliales de quelques tubes contournés. Par contre, chez les cobayes tués par le sérum néphrotoxique plus actif, et ayant présenté, à la suite de l'injection de ce sérum dans les urines, une quantité d'albumine plus notable, les modifications anatomo-pathologiques des reins étaient également plus prononcées. Ces modifications, outre l'hyperémie plus considérable des vaisseaux, des glomérules et des capillaires du tissu interstitiel, portaient aussi sur l'épithélium des tubes contournés. Ici, de même que dans le premier cas, c'étaient principalement les cellules épithéliales qui étaient très gonflées, et leur protoplasme se présentait sous forme de gros granules: mais on rencontrait aussi des cellules dont le protoplasme était soit complètement détruit, soit parfaitement homogène; dans ces derniers cas, le noyau manquait. On rencontrait quelquefois, à l'intérieur des tubes efférents, des débris cellulaires provenant des tubes contournés. Quelquefois, on voyait aussi dans les espaces interstitiels une accumulation de cellules rondes.

Ainsi, comme nous venons de le constater, les modifications anatomo-pathologiques des reins sont insignifiantes, ce qui se trouve bien en rapport avec la petite quantité d'albumine présente dans les urines.

Afin de m'assurer que, d'une part, cet effet néphrotoxique, aussi faible qu'il soit, est bien dû au sérum, et que, d'autre part, le sérum des lapins acquiert cette propriété à la suite de l'injection d'une émulsion de reins de cobayes, j'ai fait des expériences avec du sérum de lapins normaux. J'injectais à des cobayes du sérum normal à quantités égales et même supérieures à celle du sérum néphrotoxique; le résultat fut toujours négatif.

Il existe un autre fait plus probant encore. Tandis que le sérum du lapin, recueilli 8-10 jours après la dernière injection de l'émulsion rénale, est toxique pour les cobayes, le sérum du

même lapin, prélevé non 10 jours après, mais 3 mois et demi après, devient aussi inoffensif qu'il l'était avant l'injection de l'émulsion, c'est-à-dire qu'avec le temps il a complètement perdu sa faculté néphrotoxique.

Le sérum néphrotoxique possède une autre propriété ; il est non seulement néphrotoxique, il est aussi hémolytique. Bien que cette dernière propriété soit très faible, on pouvait se demander cependant si la présence de l'albumine dans les urines et les modifications anotomo-pathologiques des reins n'étaient pas déterminées par cette propriété hémolytique du sérum. Mais les expériences, faites avec du sérum hémolytique pur, démontrèrent qu'il n'en était rien. Tous les cobayes qui avaient reçu, en injections sous-cutanées, du sérum hémolytique très actif (deux parties de sérum additionnées d'une partie de sang défibriné dissolvaient complètement tous les globules rouges au bout d'une heure), à la dose de 10 c. c. par kilo, succombaient le 4e ou 5e jour ; mais tant qu'ils vivaient, leur urine ne renfermait point d'albumine, et les lésions anatomo-pathologiques étaient tout autres que celles que l'on observe à la suite de l'injection néphrotoxique. Après l'injection du sérum hémolytique, l'épithélium rénal paraissait tout à fait normal, tandis que, à la suite du sérum néphrotoxique, il était légèrement modifié ; la différence était surtout évidente pour les vaisseaux. Après le sérum néphrotoxique, les vaisseaux étaient fortement hyperémiés, tandis qu'après le sérum hémolytique l'anémie des vaisseaux était si prononcée qu'il fut presque impossible de rencontrer des globules rouges, soit dans les vaisseaux des glomérules, soit dans les capillaires des espaces interstitiels ; on ne trouvait de gros globules rouges que dans les plus gros vaisseaux. Il est donc évident que le sérum des lapins, auxquels on avait fait des injections de tissu rénal du cobaye, acquiert des propriétés toxiques spécifiques pour les reins des cobayes.

Par analogie avec d'autres cytotoxines, on pouvait supposer que le sérum des cobayes auxquels on avait injecté de l'émulsion de reins des lapins posséderait aussi, vis-à-vis de ces derniers, des propriétés néphrotoxiques. Des expériences que j'ai faites à cet effet, il résulte que le sérum des cobayes ayant reçu 3 fois une émulsion de reins de lapins sains (pour chaque injection on préparait une émulsion avec un quart de rein), jouit

d'une propriété néphrotoxique extrêmement faible. Sur 4 lapins auxquels on avait injecté 6 c. c. de sérum par kilogramme, 3 présentèrent dans les urines des traces d'albumine et le 4e n'en a pas eu du tout. Un des trois lapins mourut le 5e jour, il avait presenté pendant ces 5 jours des traces d'albumine; le second a eu de l'albumine seulement pendant les 3 premiers jours; et enfin le 3e n'en eut que le lendemain après l'injection du sérum.

A 2 autres lapins, j'ai injecté dans les veines de l'oreille 5 c. c. de sérum par kilo; j'ai trouvé des traces d'albumine dans les urines, chez l'un pendant 4 jours, et chez l'autre pendant 2 jours, ensuite l'albumine disparut complètement.

Toutes ces expériences montrent que sous l'influence des injections hypodermiques d'une émulsion de reins d'animaux sains apparaissent dans le sang des lapins et des cobayes des substances qui exercent un effet nocif sur les reins de l'espèce animale dont les organes ont servi à la préparation de l'émulsion. Mais cette propriété néphrotoxique du sérum est extrêmement faible, surtout celle du sérum des cobayes. Il est fort probable que cette faculté serait plus prononcée s'il était possible d'augmenter les doses d'émulsion, ainsi que le nombre d'injections. Mais les lapins et les cobayes supportent mal ces injections, c'est pourquoi on est obligé de faire un nombre d'injections très limité, d'employer des doses d'émulsion très petite. C'est là, je crois, l'explication de ce que les animaux aussi petits et aussi peu résistants que le sont les cobayes et les lapins ne peuvent fournir un sérum néphrotoxique très actif. Pour obtenir un tel sérum, il faudrait s'adresser à des animaux plus grands et plus résistants, car il semble que l'élaboration et l'accumulation des cytotoxines dans l'organisme soient subordonnées à la fois à la dose de substance injectée et au nombre d'injections.

Au moyen du lapin et du cobaye, on ne peut donc obtenir un sérum néphrotoxique puissant. C'est pourquoi j'ai cherché à en obtenir par un autre procédé. Cependant, les expériences dont il va être question doivent être considérées comme des expériences préliminaires. Elles ont besoin d'être contrôlées et étudiées davantage. C'est ce que je compte faire prochainement.

Le raisonnement suivant m'a suggéré ces expériences. D'une part, chez l'homme, dans les maladies des reins, chroniques ou

aiguës, il se produit dans l'organisme une accumulation de substances toxiques, laquelle a pour conséquence l'urémie.

D'autre part, nous savons que chez les animaux la ligature des urétères amène la mort, par urémie aussi Si l'on fait la ligature d'un seul urétère, il se produit des modifications de différents organes qui rappellent celles qu'on observe dans la néphrite chronique chez l'homme, et notamment l'hyperémie du cœur, des stases sanguines dans le foie et la rate : puis, à la longue, l'autre rein devient aussi malade.

Tous ces phénomènes montrent qu'à la suite de la ligature d'un urétère il se produit progressivement dans l'organisme de l'animal une accumulation des matières toxiques, qui explique les modifications qu'on rencontre dans les différents organes.

En prenant en considération ces faits, je me suis demandé si le sérum du lapin auquel on a lié un seul urétère n'exercerait pas une action néphrotoxique vis-à-vis d'autres animaux sains.

Pour résoudre ce problème, j'ai lié l'urétère d'un côté chez deux lapins sains. Ces animaux supportèrent l'opération très bien : la plaie se cicatrisa sans suppuration, les animaux se rétablirent rapidement et leur poids commença à augmenter. Vingt-et un jours après la ligature, j'ai pris du sang à l'artère carotide chez l'un deux, et j'ai injecté 4 c. c. (par kilo) de sérum dans les veines auriculaires de deux lapins sains : les urines de ces lapins étaient examinées pendant plusieurs jours avant l'injection sans qu'on ait pu constater la présence de l'albumine.

Dès le lendemain de l'injection, l'urine de ces deux lapins renfermait de l'albumine en notable quantité; elle diminua ensuite progressivement pendant 5 jours et finit par disparaître complètement.

L'autre lapin auquel j'ai lié un urétère fut saigné 41 jours après l'opération; j'ai injecté 5 c. c. (par kilo) de ce sérum à deux autres lapins sains dont l'urine ne contenait point d'albumine avant l'expérience. Chez l'un d'eux, après l'injection du sérum, il y a eu pendant 4 jours une petite quantité d'albumine dans les urines; chez l'autre, il y en a eu pendant les trois premiers jours une grande quantité, mais dès le quatrième elle diminua rapidement. La présence dans les urines d'une si grande quantité d'albumine pendant les trois premiers jours après l'injection du sérum, ne laissait presque pas de doute que les reins étaient

lésés. Cependant, pour en être bien sûr, j'ai sacrifié l'animal le septième jour après l'injection du sérum (il avait encore de l'albumine dans ses urines); à l'autopsie j'ai trouvé les reins légèrement augmentés de volume; à la section ils étaient hyperémiés et d'une couleur grisâtre; la capsule s'enlevait facilement. Tous les autres organes, à l'examen macroscopique, ne présentaient rien d'anormal.

L'examen microscopique des reins a révélé de très profondes lésions dans toutes les parties de l'organe. Les vaisseaux des glomérules, et surtout les capillaires des espaces interstitiels étaient fortement hyperémiés. L'épithélium des tubes contournés était soit nécrosé, et dans ces cas il remplissait les tubes sous forme de cylindres, soit vacuolisé, et alors les noyaux manquaient totalement, ou bien ils étaient considérablement modifiés; ces noyaux avaient une forme irrégulière et étaient comme ratatinés. L'épithélium des tubes droits était moins altéré. Cependant dans certains de ces tubes on voyait une masse informe, composée de cellules épithéliales complètement détruites. On rencontrait très souvent dans les espaces interstitiels une accumulation de cellules rondes, entourant de tous côtés les tubes contournés, dont quelques-uns étaient presque normaux ou très peu modifiés. En général, toutes ces modifications avaient le caractère de celles que l'on trouve dans l'inflammation diffuse des reins; c'est ce qui explique la présence de la grande quantité d'albumine dans les urines.

Ces expériences donnèrent donc des résultats positifs. Elles démontrèrent que le sérum des lapins, auxquels on a lié un des urétères, acquiert réellement, au bout d'un temps assez court, une faculté néphrotoxique très forte. Cette faculté paraît augmenter avec le temps, car le sérum pris six semaines après la ligature était plus fort que celui qui a été pris seulement après trois semaines.

Il reste à savoir d'où arrive dans l'organisme de l'animal cette toxine? Il est fort probable que la formation de la toxine se produit ici de la même façon que chez les animaux auxquels on injecte une émulsion de reins. Cette supposition est confirmée par les altérations qui se produisent dans le rein dont l'urétère est lié. Quand on examine au microscope les coupes de ces reins, 3-6 semaines après la ligature, on voit que les cellules

épithéliales des tubes collecteurs sont atrophiées; les glomérules, pour la plupart du temps, sont peu modifiés; ce sont surtout les cellules épithéliales des tubes contournés qui sont les plus altérées : leur protoplasma est considérablement vacuolisé; dans de très nombreuses cellules il est disposé à la périphérie sous forme d'une couche très mince, composée de granules de différentes dimensions; les noyaux manquent dans la plupart des cas, ou bien ils sont très modifiés.

Il faut donc conclure que la ligature d'un urétère rend possible la pénétration dans la circulation de certaines substances spécifiques qui se trouvaient auparavant dans les cellules propres de rein. C'est ainsi que se trouve créée la propriété néphrotoxique du sérum des animaux dont un des urétères est lié. En outre, cette propriété néphrotoxique peut aussi dépendre de ce que les substances, qui devraient être complètement éliminées de l'organisme, y séjournent, et ainsi se fait une accumulation de produits toxiques; parmi ces derniers se trouvent aussi ceux qui produisent un effet spécifique sur les reins. Cela se confirme aussi par ce fait qu'au bout d'un certain temps, chez l'animal auquel on avait lié un urétère, l'autre rein devient malade.

Quant à la nature de cette néphrotoxine, il nous est encore impossible de nous prononcer à ce sujet. Les expériences ultérieures nous montreront si c'est une isotoxine, ou bien si c'est une néphrotoxine dans le plus large sens du mot.

C'est à M. Metchnikof que je dois l'idée fondamentale de cette étude. Je considère comme un agréable devoir de lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir indiqué ce sujet, pour m'avoir guidé par ses conseils éclairés et enfin pour m'avoir autorisé à travailler à son laboratoire.

Je venais de terminer mon article lorsque M. le docteur Lindemann a fait une communication concernant le sérum néphrotoxique (*Centralbl. f. allg. Pathol.* XI, p. 308. 1900). Dans cette communication il attire l'attention sur ce fait que le sérum du sang des chiens qui ont eu une néphrite à la suite de l'introduction, dans leur sang, de chromate de potasse ou d'autres poisons rénaux, exerce une très forte action néphrotoxique sur d'autres chiens. Ces expériences confirment, jusqu'à un certain

degré, l'hypothèse qui admet que le sang renferme des poisons rénaux au cours des néphrites.

APPENDICE

Expérience I.

A. Le 17 *mars* 1900. Injection hypodermique d'émulsion des 2 reins de cobaye à un lapin pesant 1,720 grammes.

Le 27 *mars.* Deuxième injection d'émulsion de 2 reins de cobaye.

Le 5 *avril.* Saignée à l'artère carotide afin d'obtenir du sérum.

B. Le 6 *avril.* Injection de 2 c. c. de sérum du lapin A dans la peau du ventre d'un cobaye pesant 420 grammes.

Le lendemain de cette injection du sérum, l'urine renferme des traces d'albumine. Ces traces persistent jusqu'à la mort de l'animal, qui survient le 15 avril. Pendant cette période de temps, le poids de l'animal a diminué de 60 grammes.

L'examen microscopique des reins de ce cobaye montre un gonflement de l'épithélium des tubes contournés; une légère hyperémie des vaisseaux, des glomérules et des capillaires des espaces interstitiels; sur certaines coupes on voit dans ces espaces une légère accumulation de cellules rondes.

Expérience II.

A. Le 27 *mars.* Injection hypodermique d'émulsion de 2 reins de cobaye à un lapin pesant 1,605 grammes.

Le 8 *avril.* Deuxième injection d'émulsion de 2 reins de cobaye.

Le 19 *avril.* Saignée par l'artère carotide.

Force hémolytique du sérum de ce lapin : 6 parties de sérum mélangées à 1 partie de sang défibriné n'ont pas amené au bout de 3 heures une complète dissolution, bien qu'il y ait eu déjà beaucoup de globules rouges détruits.

B. Le 20 *avril.* Injection de 5 c. c. de sérum du lapin A sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 580 grammes.

Pendant les deux premiers jours après l'injection du sérum, il y a des traces d'albumine dans les urines, puis l'albumine disparaît, puis reparaît de nouveau au bout de 8 jours, c'est-à-dire le 28 avril. A partir de cette date jusqu'à la mort de l'animal qui a eu lieu le 7 mai, l'urine contient toujours de l'albumine, bien qu'en quantité minime. Après l'injection l'animal a vécu 17 jours. Son poids a baissé de 240 grammes.

A l'autopsie : Les reins sont hyperémiés, la capsule s'enlève facilement, les limites entre les différente couches sont peu distinctes.

A l'examen microscopique : Forte hyperémie des glomérules et des vais-

seaux de la couche pyramidale; gonflement de l'épithélium des tubes contournés et des cellules du tissu conjonctif.

Expérience III.

A. *Le 26 mars.* Injection hypodermique d'émulsion de deux reins de cobaye à un lapin pesant 1,765 grammes.

Le 4 avril. Deuxième injection d'émulsion de deux reins de cobaye.

Le 26 avril. Troisième injection d'émulsion de 2/3 de reins de cobaye.

Le 11 mai. Quatrième injection d'émulsion d'un rein.

Le 17 mai. Saignée de 25 c. c. de sang par l'artère carotide.

B. Le 18 mai. 1) Injection de 8 c. c. de sérum du lapin A sous la peau d'un cobaye pesant 780 grammes.

Le lendemain de l'injection, l'urine renferme des traces d'albumine. Le troisième jour après l'injection, forte diarrhée, et le 28 mai, c'est-à-dire le sixième jour, l'animal succombe. Son poids a diminué de 165 grammes. Les cultures faites avec du sang du cœur sont restées stériles.

Autopsie : Reins mous, hyperémiés, légèrement augmentés de volume, la capsule s'enlève facilement; à la section on distingue mal les limites des différentes couches.

Examen microscopique des reins : Hyperémie très prononcée des vaisseaux des glomérules et des vaisseaux de la couche pyramidale. Épithélium des tubes contourné et gonflé; quelquefois on rencontre des tubes contournés dont l'épithélium est totalement détruit, ou bien ces cellules ont le protoplasma homogène et sans noyau. A l'intérieur d'un petit nombre de tubes collecteurs, on voit un amas de débris de cellules épithéliales des tubes contournés. On rencontre aussi quelquefois, autour des glomérules et dans les espaces interstitiels, une accumulation de cellules rondes.

2) *Le 18 mai* Injection de 6 c. c. de sérum d'un lapin sain sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 575 grammes.

L'animal a été en observation pendant 15 jours. L'analyse des urines a été faite quotidiennement. Point d'albumine.

Expérience IV.

A. *Le 23 mai.* 8 jours après la première saignée, cinquième injection hypodermique d'émulsion d'un rein de cobaye au lapin de l'*expérience III.*

Le 20 mai. Saignée par l'artère carotide; 40 c. c. de sang.

B. Le 30 mai. Injection de 30 c. c. de sérum du lapin A dans la région abdominale d'un cobaye pesant 565 grammes.

Dès le lendemain de l'injection, l'urine renferme des traces d'albumine qui persistent jusqu'au 11 juin; depuis, l'albumine n'a plus reparu. L'animal est resté en surveillance jusqu'au 1er juillet; pendant toute cette période il a été bien portant et a augmenté de poids de 50 grammes.

2) *Le 30 mai.* Injection de 8 c. c. de sérum du lapin A sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 725 grammes.

Dès le lendemain de l'injection, l'urine renferme des traces d'albumine :

tous les jours la quantité d'albumine augmente, de sorte que le septième jour elle est déjà assez considérable; le poids a diminué de 130 grammes, et l'animal est si faible que probablement il n'aurait pas pu survivre jusqu'au matin; c'est pourquoi je le sacrifie.

A l'autopsie : Les reins très flasques; au-dessous de la capsule on voit des hémorragies miliaires, la capsule s'enlève facilement; à la section les reins sont de couleur grisâtre; les couches se distinguent mal; les veines sont distendues par le sang.

Examen microscopique : Forte hyperémie des vaisseaux des glomérules; dans quelques-uns de ces derniers de petites hémorragies; autour des glomérules et dans les espaces interstitiels on rencontre souvent des amas considérables de cellules rondes; l'épithélium des tubes contournés est fortement gonflé : à peine quelques cellules manquent de noyaux et ont le protoplasma presque complètement détruit.

Expérience V.

A. Lapin, pesant 2,200 grammes, a reçu au niveau de la région abdominale 4 injections hypodermiques d'émulsion de reins de cobaye. La première injection d'émulsion rénale a été faite le 18 juin. La deuxième (un rein le 25 juin; la troisième (un rein) le 2 juillet, et la quatrième (un rein) le 12 juillet.

Le 20 juillet. Saignée par l'artère carotide. Pouvoir hémolytique de ce sérum : 5 parties de sérum mélangées à 1 partie de sang défibriné de cobaye ont dissous, au bout d'une heure, un grand nombre de globules rouges; cependant, au bout de 3 heures, il en restait encore passablement qui n'étaient pas attaqués.

B. Le 21 juin. Injection de 6 c. c. de sérum du lapin A, sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 565 grammes. L'urine a renfermé des traces d'albumine seulement pendant les deux premiers jours après l'injection, puis l'albumine disparaît et ne reparaît plus pendant toute la durée de l'expérience (10 jours); le cobaye se portait bien, et avait augmenté de poids.

2) *Le 21 juillet.* Injection de 5 c. c. et 1/2 de sérum du lapin A, sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 545 grammes. Le lendemain de l'injection, l'animal a émis quelques gouttes d'urine seulement; il a été très malade et n'a pas mangé. Le deuxième jour, il y a eu 6 c. c. d'urine, qui renfermaient une notable quantité d'albumine. Dans la nuit du troisième au quatrième jour, l'animal succomba ayant perdu 30 gr. de son poids.

Autopsie : Les reins sont fortement hypérémiés, surtout la couche intermédiaire; à la section ils sont d'une couleur grisâtre; les couches se distinguent mal; la capsule s'enlève facilement.

L'examen microscopique révéla les mêmes altérations que celles du second cobaye de l'expérience 4.

Expérience VI.

A. Le lapin de l'expérience I, après saignée du 5 avril, n'a plus eu d'injection; il a bien supporté l'opération, s'est vite rétabli et a commencé à aug-

menter de poids : il pesait 1,815 grammes au moment de la deuxième saignée qui a eu lieu le 20 juillet. Le pouvoir hémolytique du sérum de cette seconde saignée ne se distinguait en rien de celui du sérum du sang normal.

B. Le 21 juin. Injection de 5 c. c. 1/2 de sérum du sang du lapin A sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 535 grammes. Pendant toute la durée de l'observation (environ 12 jours) l'urine ne renfermait point d'albumine, l'animal se portait bien et avait augmenté de poids.

Expérience VII (avec le sérum hémolytique).

A. Le 19 septembre. Injection de 9 c. c. de sérum du sang frais défibriné d'un cobaye normal sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,930 gr.

Le 26 septembre. Deuxième injection de 15 c. c. de sang frais défibriné d'un cobaye normal.

Le 4 octobre. Saignée par l'artère carotide (40 c. c. de sang). Le sérum de ce sang possédait une propiété hémolytique très puissante : deux parties de sérum, mélangées à une partie de sang défibriné d'un cobaye, dissolvaient complètement tous les globules rouges au bout de une heure et demie.

B. Le 5 octobre. Injection de 4 c. c. et 1/2 de sérum du sang du lapin A à trois cobayes pesant 420, 435 et 430 grammes.

Tous les trois cobayes succombèrent ; le premier, le quatrième jour ; les deux autres le cinquième jour après l'injection, sans présenter d'albumine dans les urines.

A l'autopsie : Des hémorragies miliaires sous la peau, dans certains muscles et sur les parois du péritoine ; tous les organes avaient plus ou moins une teinte ictérique ; le sang du cœur et des grands vaisseaux avait l'aspect laqué ; la vessie chez deux de ces lapins était remplie d'urine paraissant sanguinolente ; cependant, à l'examen microscopique, il fut impossible de trouver dans cette urine des globules rouges, pas plus que des éléments propres de rein. Ces derniers organes étaient flasques, à la section le parenchyme était d'un jaune pâle. Les cultures faites avec du sang du cœur restèrent stériles.

Ce qui frappait le plus à l'examen microscopique, c'était l'absence de globules rouges dans les vaisseaux des glomérules et dans les capillaires des espaces interstitiels. Quant à l'épithélium rénal, il ne présentait presque pas d'altérations, sauf que les dimensions des granules protoplasmiques étaient un peu plus grandes qu'à l'état normal.

Expérience VIII.

A. Le 15 juin. Injection d'émulsion d'un quart de rein de lapin sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 624 grammes.

Le 22 juin. Deuxième injection de la même quantité d'émulsion.

Le 29 juin. Troisième injection d'émulsion d'un quart de rein.

Le 6 juillet. Saignée par l'artère carotide. Effet hémolytique de ce sérum : 6 parties de sérum mélangées à 1 partie de sang défibriné de lapin dissolvaient les globules rouges.

B. Le 7 juillet. Injection de 10 c. c. de sérum du cobaye sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,940 grammes.

Dès le lendemain, l'urine renfermait de l'albumine (traces), et cette albumine a persisté jusqu'à la mort de l'animal, qui a eu lieu le cinquième jour après l'injection de sérum.

A l'autopsie : Les reins étaient œdématiés; la couche intermédiaire était fortement hyperémiée; la capsule s'enlevait facilement. Les cultures faites avec du sang du cœur sont restées stériles.

A l'examen microscopique : Les cellules épithéliales des tubes contournés avaient pour la plupart un protoplasma composé de gros granules; quelquefois on rencontrait des cellules sans noyau, et enfin un petit nombre de cellules avaient un protoplasma complètement homogène, les vaisseaux des glomérules et les capillaires des espaces interstitiels étaient fortement hyperémiés.

Expérience IX.

A. Le 15 juin. Injection d'émulsion d'un quart de rein de lapin sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 595 grammes.

Le 22 juillet. Deuxième injection d'un quart de rein de lapin.

Le 29 juillet. Troisième injection de la même quantité d'émulsion.

Le 6 juillet. Saignée par l'artère carotide. Effet hémolytique de ce serum. 5 parties de sérum, mélangées à 1 partie de sang défibriné de lapin, dissolvaient tous les globules rouges.

B. Le 7 juillet. Injection de 7 c. c. de sérum du cobaye A dans la veine de l'oreille d'un lapin pesant 2,245 grammes. Pendant les 4 premiers jours après l'injection de sérum, l'urine renfermait des traces d'albumine; à partir du 5e jour l'albumine disparaît et ne reparaît plus pendant toute la durée de l'expérience.

Expérience X. (Contre-épreuve de l'expérience VIII.)

A. Le 7 juillet. Injection de 12 c. c. de sérum du sang d'un cobaye sain sous la peau du ventre d'un lapin pesant 2,225 grammes. Pendant toute la durée de l'expérience (environ 14 jours) l'urine n'a pas renfermé d'albumine. L'animal se portait parfaitement bien.

Expérience XI.

A. Le 12 juillet. Injection d'émulsion d'un quart de rein de lapin sous la peau du ventre d'un cobaye pesant 527 grammes.

Le 20 juillet. Deuxième injection de la même quantité d'émulsion.

Le 21 juillet. Troisième injection d'émulsion d'un quart de rein.

Le 6 août. Saignée par l'artère carotide.

B. Le 7 août. Injection de 10 c. c. de sérum du cobaye A sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,515 grammes.

Pendant les 3 premiers jours, l'urine renfermait des traces d'albumine. Puis l'albumine disparut et ne reparut plus. L'animal s'est rétabli.

Expérience XII.

A. Un cobaye pesant 715 grammes a reçu, sous la peau du ventre, 3 injections d'émulsion de rein de lapin sain (chaque fois 1/4 de rein) ; ces injections eurent lieu le 12 juillet, le 20 juillet et le 27 juillet.

Le 6 *août*. Saignée par l'artère carotide.

B. *Le* 7 *août*. Injection de 7 c. c. de sérum du cobaye A dans la veine de l'oreille d'un lapin pesant 1,490 grammes. Seulement pendant les 2 premiers jours après l'injection, il y a eu des traces d'albumine dans les urines. Ensuite, pendant toute la durée de l'expérience, l'animal se portait bien.

Expérience XIII. (Servant de témoin pour l'expérience XI.)

Le 7 *août*. Injection de 9 c. c. de sérum de cobaye sain sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,470 grammes. Pendant toute la durée de l'expérience, l'animal se portait bien et l'urine ne renfermait pas d'albumine.

Expérience XIV.

A. Un cobaye pesant 650 grammes a reçu sous la peau du ventre 3 injections d'émulsion de rein de lapin sain (chaque injection était préparée avec un quart de rein) ; ces injections eurent lieu le 9, le 16 et le 23 août.

Le 31 *août*. Saignée par l'artère carotide. L'effet hémolytique de ce sérum fut très faible.

B. *Le* 1er *septembre*. Injection 9 c. c. de sérum du cobaye A sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,600 grammes.

Pendant toute la durée de l'expérience, l'animal reste bien portant, son poids augmente, et l'urine ne renferme point d'albumine.

Expérience XV.

A. Un cobaye pesant 550 grammes a reçu 3 injections hypodermiques d'émulsion de rein de lapin normal (chaque fois 1/4 de rein) : ces injections eurent lieu le 9, le 16 et le 23 août.

Le 31 *août*. Saignée par l'artère carotide, 5 parties de ce sérum mélangées à une partie de sang défibriné de lapin, commençaient à dissoudre les globules rouges au bout d'une heure.

B. *Le* 1er *septembre*. Injection de 9 c. c. de sérum du cobaye A sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,550 grammes.

Seulement le lendemain, après l'injection de sérum, il y a eu des traces d'albumine dans les urines. Ensuite elle disparut sans plus reparaître. Penpant toute la durée de l'expérience l'animal se porta parfaitement bien.

Expérience XVI. (Contre-épreuve des expériences XIV et XV.)

A. Un cobaye pesant 500 grammes, a reçu sous la peau du ventre trois injections de 5 c. c. chaque fois de sang défibriné de lapin normal ; ces injections eurent lieu le 9, le 16 et le 23 août.

Le 31 août. Saignée par l'artère carotide. En mélangeant 3 parties de ce sérum à une partie de sang défibriné de lapin, on obtient au bout de 2 heures une dissolution complète des globules rouges.

B. Le 1er septembre. Injection de 6 c. c. de sérum du cobaye sous la peau du ventre d'un lapin pesant 1,450 grammes. Pendant toute la durée de l'expérience, l'urine ne renfermait pas d'albumine.

Expérience XVII.

A. Le 30 juillet 1900, on fait la ligature de l'urétère droit à un lapin pesant 1,410 grammes. L'animal a bien supporté l'opération; la plaie s'est cicatrisée sans suppuration. Le 21 août le lapin pesait 1,455 grammes; ce jour-là je lui pris 10 c. c. de sang à la carotide. Ensuite je l'ai sacrifié.

A l'autopsie : le rein droit est considérablement distendu par un liquide limpide de couleur jaune; l'urètre l'est aussi jusqu'à l'endroit où se trouve la ligature. La couche corticale du rein est considérablement atrophiée. Le rein gauche, à l'examen microscopique, ne présentait point de modifications, de même que tous les autres organes.

B. Le 22 août. Injection à deux lapins, dans les veines de l'oreille, de sérum du lapin A : 1) le premier, pesant 1,375 grammes, a reçu 5 c. c. 1/2, et 2) le second, pesant 1,625 grammes, 6 c. c. 1/2, c'est-à-dire 4 c. c. par kilo.

Dès le lendemain de l'injection, l'urine des deux lapins renfermait de l'albumine en notable quantité; les deux jours suivants il y en avait encore, mais moins. Le cinquième jour l'albumine disparut sans plus reparaître. A la suite de l'injection, le poids des deux lapins avait baissé; mais bientôt ils se rétablirent complètement.

Expérience XVIII.

A. Le 30 juillet, on pratique une ligature de l'urétère gauche à un lapin pesant 1,635 grammes. L'animal a bien supporté l'opération; la plaie s'est cicatrisée sans suppuration. Le 10 septembre le lapin pesait 1,905 gr. Ce jour-là je lui ai pris environ 10 c. c. de sang à la carotide. Ensuite je l'ai sacrifié.

A l'autopsie : Le rein gauche, de même que son urétère jusqu'à l'endroit où se trouve la ligature, sont considérablement distendus par un liquide d'un jaune foncé; toutes les couches du rein sont atrophiées et d'une couleur grisâtre. Le rein droit est légèrement augmenté de volume, à la section il paraît être tout à fait normal; tous les autres organes ne présentent rien d'anormal à l'examen microscopique.

B. I. Le 11 septembre. Injection de 8 c. c. 1/2 de sérum du sang du lapin A, dans la veine de l'oreille d'un autre lapin pesant 1,900 grammes.

Pendant les quatre premiers jours après l'injection de sérum, l'urine renfermait de l'albumine (plus que des traces) qui dès le cinquième jour disparaît sans plus reparaître.

II. Le 11 septembre. Injection de 9 c. c. 1/2 de sérum du lapin A dans la veine de l'oreille d'un troisième lapin pesant 1,885 grammes.

Pendant les trois premiers jours ayant suivi l'injection de sérum, l'urine renfermait une grande quantité d'albumine; ensuite, tous les jours la quan-

tité d'albumine diminuait. Le septième jour, quand l'animal fut sacrifié, il n'y avait que des traces d'albumine dans ses urines.

A l'autopsie : Les reins étaient un peu augmentés de volume, la capsule se décortiquait facilement ; à la section, ils étaient fortement hyperémiés et d'une coloration grisâtre. Tous les autres organes paraissaient à l'examen microscopique être normaux.

A l'examen microscopique des coupes des reins : légère hyperémie des vaisseaux des glomérules, et très forte hyperémie des capillaires des espaces interstitiels. De profondes modifications de l'épithélium des tubes contournés, se traduisant par une forte dégénérescence albuminoïde, une vacuolisation et une complète nécrose des cellules. On rencontrait souvent des amas de cellules nécrosées d'épithélium des tubes contournés ; ces amas remplissaient les tubes sous forme de cylindres. L'épithélium de certains tubes efférents étaient aussi vacuolisé, et de nombreuses cellules manquaient de noyau. On rencontrait souvent de forts amas de cellules rondes : ces amas cellulaires se trouvaient habituellement dans le voisinage des tubes contournés, qui en étaient parfois complètement recouverts. Ces tubes, ainsi entourés de cellules rondes, avaient en général leur épithélium intact, ou tout au moins très peu altéré.

EXPLICATION DES FIGURES DES PLANCHES I ET II

Fig. 1. — Coupe du rein du lapin de l'expérience XVIII. Vacuolisation et nécrose des cellules épithéliales des tubes contournés. A l'intérieur de certains tubes on voit des amas d'épithélium détruit. (Verick. Ocul. 1. Obj. 4. Grossiss. 190).

Fig. 2. — Coupe du rein du même lapin. A l'intérieur d'un tube se trouve un cylindre composé d'un épithélium nécrosé. (Verick. Ocul. 1 Obj. 4. Grossiss. 190.)

Fig. 3. — Coupe du rein du même lapin. Un tube droit dont l'épithélium est complètement nécrosé et qui remplit le tube sous forme d'un cylindre granuleux. (Verick. Ocul. 1. Obj. 4. Grossiss. 190.)

Fig. 4. — Coupe du rein du même lapin. Forte infiltration par des cellules rondes, siégeant entre les tubes contournés (Ocul. 2. Obj. imm. 1/15.) et autour d'eux.

BIBLIOGRAPHIE

1) *Annales de l'Institut Pasteur*, juin 1900.
2) *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1898.
3) *Berliner klinische Wochenschrift*, 1899. Nos 1 et 22; 1900, no 21.
4) *Münchener medicinische Wochenschrift*, 1899, nos 13 et 14.
5) *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1899.
6) *Centralblat f. Bakteriologie*, avril 1899.
7) *Annales de l'Institut Pasteur*, septembre 1900.
8) *Münchener med. Wochensch.*, 1899, no 38.
9) *Annales de l'Institut Pasteur*, février 1900.
10) *Deutsche med. Wochensch.*, 1900, no 27.
11) *Semaine médicale*, 1900, no 35, p. 290.

LES BACTÉRIES LACTIQUES ET LEUR IMPORTANCE dans la maturation du fromage.

Par R. CHODAT et N. O. HOFMAN-BANG

L'une des questions les plus étudiées de la bactériologie technique est sans contredit celle de la maturation des fromages. Depuis que M. Duclaux, dans ses travaux classiques sur le lait, a guidé ces investigations vers une voie rationnelle, on a beaucoup travaillé à élucider les problèmes plus ou moins compliqués qui surgissaient au fur et à mesure que les recherches s'approfondissaient. On constatait, entre autres, que pendant la maturation d'un fromage, la caséine de celui-ci se transforme profondément. Lorsque M. Duclaux eut découvert dans le fromage les microbes dits *Tyrothrix*, qui peuvent solubiliser la caséine du lait de la même manière que se transforme la caséine du fromage, la plupart des savants furent d'accord pour attribuer à ce genre de microbes le rôle de faire mûrir les fromages.

C'est en partant de ce point de vue que l'on établit les théories relatives à la marche de la maturation. Les expériences tentées pour les démontrer furent faites sur le lait, parfois sur des fromages, mais le plus souvent les auteurs se contentèrent d'utiliser les résultats obtenus, soit en discutant des observations tirées de la pratique, soit en raisonnant sur l'interprétation des résultats de la fromagerie. Ces différentes façons d'étudier la question ont pu paraître suffisantes tant que ces théories n'étaient pas attaquées; elles ne peuvent être que très secondaires dès qu'il s'agit de les défendre par des argument réellement scientifiques.

M. de Freudenreich est l'adversaire principal de ces théories, et comme il est en contradiction complète avec ceux qui admettent les *Tyrothrix* comme agents essentiels de la maturation du fromage, il nous faut examiner son point de vue un peu plus en détail.

En faisant un très grand nombre d'analyses bactériologiques de fromages d'Emmenthal bien mûrs, M. de Freudenreich ne trouve que très peu de *Tyrothrix*, mais des quantités énormes de bactéries lactiques. (Des résultats identiques ont été obtenus par MM. Russell et Weinzirl, *Centralblatt für Bacteriologie*, 1897, p. 456, et dernièrement ici au laboratoire par M. Stamen Grigoroff.) C'est cette constatation qui lui fait croire que ce sont les bactéries lactiques et non pas les *Tyrothrix* qui sont les vrais agents de la maturation du fromage. Il fait voir en outre que les *Tyrothrix* disparaissent progressivement du fromage et même assez vite; par des numérations, il prouve qu'ils sont remplacés par des bactéries lactiques qui, peu à peu, se multiplient énormément. Il en est de même si on fait un fromage avec un lait auquel on a ajouté des quantités très fortes de *Tyrothrix*.

Si les bactéries lactiques font vraiment mûrir les fromages, elles doivent pouvoir attaquer, c'est-à-dire solubiliser la caséine. M. de Freudenreich s'efforce de démontrer que la caséine d'un lait ensemencé avec des bactéries lactiques se transforme et devient soluble dans l'eau. Ce lait, d'après lui, contient justement les mêmes combinaisons amidées que l'on rencontre dans un fromage d'Emmenthal bien mûr.

Enfin, M. de Freudenreich indique que les fromages faits avec du lait auquel on a ajouté des bactéries lactiques contiennent plus de combinaisons amidées que des fromages faits avec du lait auquel on a ajouté des microbes appartenant au groupe des *Tyrothrix*.

De toutes ces circonstances il lui semble résulter (*Centralblatt. f. Bact.*, 1900, p. 146) « que les *Tyrothrix* ne jouent aucun rôle dans la maturation d'un fromage d'Emmenthal ».

Il nous semble un peu hasardé de tirer une telle conclusion de ces constatations.

Du fait que les *Tyrothrix* diminuent, puis disparaissent d'un fromage, ou que dans un fromage bien mûr il ne s'en trouve que très peu, on peut seulement déduire qu'au moment où l'analyse a été faite le rôle direct de ces microbes est terminé. Par conséquent il n'est pas permis de prétendre qu'ils n'ont joué antérieurement aucun rôle, et que les bactéries lactiques soient les seuls agents actifs de la maturation.

Le fait que M. de Freudenreich trouve plus de combi-

sons amidées dans les fromages ensemencés avec des bactéries lactiques que dans des fromages inoculés avec des Tyrothrix n'autorise pas à tirer la conclusion à laquelle aboutit ce savant; car la seule conclusion strictement logique pourrait être la suivante : les combinaisons amidées sont caractéristiques pour le fromage d'Emmenthal; les bactéries lactiques peuvent fabriquer ces combinaisons en quantité suffisamment grande; par conséquent les bactéries lactiques sont nécessaires. Enfin, la formation de ces combinaisons amidées n'est qu'une partie secondaire de la maturation; par conséquent, M. de Freudenreich a tort d'en conclure sans autre que les *Tyrothrix* sont superflus dans tout le phénomène de la maturation.

En disant que la production de corps amidés n'est qu'une partie secondaire de la maturation, nous touchons au point qui devrait être fondamental et dans la défense et dans l'attaque des théories de M. de Freudenreich. En effet, pour que des corps amidés puissent se former, il faut d'abord que la caséine soit assimilable, c'est-à-dire soluble dans l'eau.

M. de Freudenreich semble bien s'en rendre compte quand il essaye de démontrer que les bactéries lactiques peuvent attaquer et transformer la *caséine d'un lait:* mais prouver que les bactéries lactiques peuvent attaquer la caséine d'un lait n'est pas démontrer qu'elles puissent attaquer la *caséine coagulée :* ces deux milieux sont si différents qu'il n'est pas permis d'appliquer *a priori* à la caséine coagulée les résultats que l'on a obtenus en travaillant sur le lait.

On voit ainsi que les théories de M. de Freudenreich, quoique pouvant être justes, ne sont nullement prouvées, et que c'est précisément dans la question principale, la solubilisation de la caséine coagulée, que le manque de preuves est le plus sensible.

C'est bien aussi sur ce point que les adversaires des théories de M. de Freudenreich ont porté leur attention. Bien des tentatives ont été faites direction pour élucider cette question. Citons en particulier les travaux de M. Weigmann [1], ceux de MM. Boekhout et de Vries [2], et enfin ceux de M. Adametz, que

1. Weigmann, *Centralblatt für Bacteriologie*, etc., 1898, p. 593; id., 1900, 630.
2. Boekhout et de Vries, *id.*, 1899, p. 304.

nous n'avons malheureusement pas pu utiliser comme nous le désirions.

MM. Boekhout et de Vries, en particulier, ont montré que des fromages qui ne contiennent que des bactéries lactiques ne mûrissent pas. Il semble donc tout au moins que la théorie de M. de Freudenreich ne se laisse pas appliquer à *tous les fromages de pâte dure*, comme ce savant semble avoir voulu le prétendre[1].

Cependant de tels essais faits sur un nombre de fromages aussi restreint permettent encore le doute, car une foule de circonstances, telles que l'acidité, les différences de présure et de température, etc., ont pu influencer les résultats. En outre, il peut paraître encore possible que les théories de M. de Freudenreich soient exactes en ce qui concerne les fromages suisses à pâte dure (Emmenthal). Aussi longtemps que d'un côté ses contradicteurs n'auront pas prouvé par des expériences irréprochables que les bactéries lactiques ne peuvent pas dissoudre la caséine coagulée, ils n'auront pas prouvé l'impossibilité de ses théories; mais d'autre part, aussi longtemps que M. de Freudenreich n'aura pas fourni des preuves irréfutables de ce qu'il avance, ses théories ne reposeront sur aucune base solide. Lorsqu'on aura acquis la certitude absolue que les bactéries lactiques sont capables de dissoudre la caséine coagulée, il sera temps d'examiner si, se trouvant dans un fromage particulier, elles peuvent donner à celui-ci l'arome et la saveur que l'on désire spécialement voir se développer dans cette sorte de fromage.

Vu la grande importance qu'il pourrait y avoir pour l'industrie laitière d'élucider le côté bactériologique de la maturation du fromage, nous nous sommes mis il y a presque trois ans à l'étude des microorganismes des fromages d'Emmenthal et de Gruyère. Tout naturellement notre attention s'est d'abord portée vers les *Tyrothrix* que nous avons rencontrés dans les fromages de Gruyère et d'Emmenthal.

Les résultats de ces premières recherches ont été publiés[2]. Nos conclusions étaient les suivantes :

1° Une seule espèce de bactérie peut produire à la fois la solubilisation (maturation du caséum) et l'odeur caractéristique du fromage ;

1. De Freudenreich, *id.*, 1898, p. 284.
2. *Bulletin de l'herbier Boissier*, 1898, p. 713.

2° Contrairement à l'opinion de M. de Freudenreich, mais d'accord avec Duclaux, des bactéries qui ne sont pas des ferments lactiques peuvent faire mûrir le fromage;

3° L'acidité du début n'est pas nécessaire pour que le phénomène se manifeste, ainsi que semble l'admettre M. Schirokich.

L'amertume des produits obtenus fait supposer qu'à côté de ce phénomène principal de la solubilisation et de la production de l'arome, il en est d'autres, dus sans doute à des microorganismes différents, peut-être des ferments lactiques, qui influent sur la saveur.

Cette petite publication a été critiquée par M. de Freudenreich (*Centralbl. f. Bact.*, 1900, p. 15) qui semble prétendre que nous avons mesuré la maturation de la caséine par ce seul caractère de l'odeur du fromage[1]. M. de Freudenreich n'a pas remarqué, paraît-il, que nous avons constaté une dissolution complète de notre caséine, et que par conséquent il était superflu d'en mesurer autrement la quantité devenue soluble, tandis qu'il était important de constater la présence de l'arome caractéristique du fromage.

Ces expériences de laboratoire, *in vitro*, demandaient à être confirmées par des essais comparables à ceux de l'industrie fromagère. C'est pourquoi nous avons tenté de les appliquer à la fabrication de petits fromages, obtenus en partant de sept litres de *lait écrémé* et stérilisé jusqu'à 120° dans l'autoclave.

La coagulation d'un lait stérilisé est assez difficile; nous l'avons réalisée de la manière suivante : le lait chauffé jusqu'à 120°, et de nouveau refroidi jusqu'à 30°, était additionné de présure liquide (Fabre), puis chauffé d'abord lentement jusqu'à 60°, puis rapidement jusqu'à 120°. Ce lait refroidi à 35° donne un coagulum qui se laisse facilement couper, brasser et mettre en forme.

On inocule la culture microbienne dans le coagulum coupé et non encore brassé.

Nous avons bientôt abandonné cette méthode et nous nous sommes arrêtés au procédé suivant : le lait stérilisé et refroidi est saturé d'acide carbonique stérile ; après cette manipulation on peut procéder comme avec un lait cru, et par conséquent il

1. La mesure de la maturation est, d'après la nomenclature de M. Duclaux, précisément le rapport entre la quantité devenue soluble et celle qui est restée insoluble.

est possible d'ensemencer les cultures dans le lait et non pas dans le coagulum.

Nous avons expérimenté avec des *Tyrothrix*, ou des bactéries lactiques, ou avec des mélanges des deux sortes de microbes. Comme, malgré toutes nos précautions, nous ne sommes jamais parvenu à éviter des contaminations (constatées par des triages), nous avons été forcé de laisser de côté ce mode d'expérimentation. C'est pourquoi nous laisserons complètement de côté les résultats que nous avons obtenus ; cependant il nous sera permis de mentionner le fait que les fromages ensemencés avec des *Tyrothrix* nous semblaient plus rapidement arriver à un état comparable à une maturation que ceux qui n'avaient reçu que des bactéries lactiques.

Ces essais ayant échoué, nous nous sommes bornés aux expériences *in vitro*, expériences qui peuvent seules fournir des résultats strictement scientifiques.

Nous nous sommes tout d'abord adressés aux bactéries lactiques, pour vérifier une fois pour toutes si les bactéries lactiques sont capables d'attaquer et de dissoudre la caséine coagulée.

Avant de donner le détail de nos recherches, il nous semble utile de fournir quelques renseignements sur les espèces mises en expérience. Nous n'avons pas essayé d'identifier nos bactéries lactiques, car si la détermination spécifique doit être faite même approximativement, elle exige un travail très grand, et si la certitude n'est pas absolue, il vaut mieux ne pas identifier les espèces mises en expérience avec des espèces déjà décrites.

Nos cinq espèces, d'ailleurs très peu différentes les unes des autres, ont été isolées de fromages d'Emmenthal bien mûrs. Elles ont été sélectionnées par la méthode, généralement employée, des triages dans des boîtes de Petri ; les milieux dont nous nous sommes servis étaient le lait écrémé dont la caséine avait été lissoute par l'addition de 2 gr. de soude caustique par litre, ou le petit-lait additionné de 2 0/0 de peptone de viande (Liebig) ; les milieux étaient solidifiés à l'aide de gélose ou de gélatine.

Après leur sélection répétée, les bactéries ont été cultivées surtout dans le petit-lait peptonisé.

Nos cinq espèces sont formées de bâtonnets immobiles ; leur largeur est d'environ 0,5 μ et leur longueur varie beaucoup. Cette dernière peut même être réduite à un tel degré que l'on pour-

rait croire avoir affaire à des *Micrococcus*. Dans des milieux liquides la longueur est généralement plus grande que sur des milieux solides. Nous n'avons jamais observé de spores. Ensemencées dans du lait, elles le font coaguler en deux jours (35°) : le lait devient alors fortement acide. Quant aux acides formés, nous les avons déterminés; les résultats sont consignés dans la table n° 1, qui indique les résultats d'une expérience faite sur du petit-lait sans peptone et qui a duré cinq semaines. L'analyse des acides volatils a été faite par la méthode de la distillation fractionnée imaginée par M. Duclaux. L'acide lactique est calculé par la différence entre les quantités de soude caustique nécessaires pour saturer la totalité d'acide et les acides volatils.

Nos	LACTOSE EN 0/0		TOTAL calculé en ac. lactique.	ACIDE lactique.	ACIDES VOLATILS		
	AU DÉBUT	FIN					
1	5,773	4,884	0,44	0,33	0,04	formique.	0,03 val.
2	5,773	4,884	0,38	0,14	0,13	—	
3	5,773	4,77	0,41	0,014	0,12	—	0,11 acétique.
4	5,773	4,75	0,54	0,43	0,05	—	
5	5,773	4,99	0,5	0,41	0,037	—	0,002 valér.

Ensemencés sur du petit-lait additionné de craie, les nos 1, 2, 3 et 5 ont détruit tout le lactose, tandis que dans le même temps le n° 4 laissait encore 4,1 de lactose. Les quantités d'acides fixe et volatil n'ont pas été déterminées avec précision.

Sur la peptone liquide sans sucre, ces microbes ne se développent pour ainsi dire pas du tout; sur ce même milieu, mais en anaérobiose, elles se développent, mais très faiblement et très lentement. Toutes ces espèces sont facultativement anaérobies, mais présentent une prédilection marquée pour l'anaérobiose. On peut déjà le remarquer dans les triages, où les petites colonies d'environ 1 millimètre de diamètre, et d'une couleur crème blanchâtre, se trouvent de préférence dans l'intérieur du milieu : quand exceptionnellement elles sont à la surface, elles y forment une couche excessivement mince, remarquablement fluorescente. En outre, ensemencées en piqûre dans la gélatine elles ne se développent pour ainsi dire pas du tout à la surface.

tandis qu'elles se multiplient dans tout le canal sous forme de granulations isolées, puis sous forme d'une ligne assez irrégulière. En strie sur la gélatine, elles forment une couche extrêmement mince d'un éclat métallique accentué; les bords de la culture sont irréguliers. La gélatine n'est jamais liquéfiée. Sur pomme de terre : couche blanche inappréciable.

Après cette courte description, passons aux expériences.

Le milieu dont nous nous sommes servi a été préparé de la manière suivante : du lait frais, écrémé à la centrifuge, a été coagulé à l'aide d'une présure liquide (Fabre) ; le coagulum séparé du petit-lait a été lavé dans l'eau courante jusqu'à disparition de la moindre trace de lactose. (L'absence parfaite de lactose a été constatée à l'aide de la liqueur cupropotassique de Fehling) : la caséine ainsi lavée a été séchée et conservée à cet état sec pour l'usage. Au moment de s'en servir, on la met dans une quantité aussi faible que possible d'eau; on stérilise trois jours de suite à 120° à l'autoclave.

Nous nous rendons bien compte qu'un tel milieu peut ne pas être identique à celui que trouvent les microbes dans un fromage : mais de tous les milieux artificiels expérimentés jusqu'à présent, c'est, à notre opinion, celui qui s'approche le plus d'un fromage, et dans tous les cas des essais faits sur ce milieu sont infiniment plus probants que des essais faits sur du lait. Nous rappelons d'ailleurs qu'aux *Tyrothrix*, cela convient parfaitement.

On peut nous demander pourquoi nous avons enlevé le sucre : la réponse se trouve dans deux faits dûment constatés : d'abord, le sucre disparaît totalement d'un fromage d'Emmenthal déjà quelques jours après sa fabrication : ensuite, l'acidité produite au début, aux dépens du sucre, par les bactéries lactiques, empêcherait leur développement continuel.

MM. Boekhout et de Vries ont montré que l'oxygène disparaît de l'intérieur d'un fromage à pâte dure, par conséquent nous avons mis nos cultures pendant toute la durée des expériences dans le vide. Nous n'avons pu obtenir qu'un vide relatif (72 c. de mercure).

Le premier essai que nous voulons mentionner avait pour but de constater les quantités de caséine qui se laisseraient transformer par les bactéries lactiques, et la marche de cette transformation pendant à peu près 3 mois.

Dans ce but nous avons ensemencé nos cinq espèces dans un grand nombre de petits flacons contenant tous 1 gr. 1/2 d'une seule et même caséine sans lactose (préparée comme il a été mentionné plus haut), et 10 c. c. d'eau de conduite.

Une série de flacons ne fut pas inoculée et servait de témoin. Tous les flacons furent mis dans le vide et dans la plus complète obscurité.

A plusieurs reprises nous avons tiré du vide un témoin et une série de 5 flacons contenant nos cinq espèces. Chaque culture fut triée pour en constater la pureté ; ensuite, toute la culture, après addition d'une même quantité d'eau distillée fut triturée aussi finement que possible, additionnée d'une même quantité de talc de Venise, filtrée et lavée avec une quantité déterminée d'eau distillée. Enfin, nous avons déterminé, à l'aide de la méthode de Kjeldahl, l'azote du filtrat et celui du résidu.

Comme nous ne prenions pas en considération les proportions de graisses et de cendres, et comme nous déterminions l'azote de la culture entière, et qu'il était impossible de tirer celle-ci du flacon sans de petites pertes de subtance, nous nous rendions bien compte qu'avec notre méthode les limites d'erreur seraient assez sensibles, et que par conséquent les résultats obtenus ne pourraient avoir qu'une valeur approximative: mais comme, d'autre part, d'après M. de Freudenreich, la dissolution de la caséine par les bactéries lactiques se fait dans une très forte proportion (15 0/0 de l'azote total d'après cet auteur), nous avons jugé notre méthode suffisante, et nous avons pensé qu'elle nous fournirait une image assez exacte de la marche du phénomène pendant les 3 mois que durerait l'expérience. Voici les résultats. Les chiffres indiquent la quantité d'azote en gramme par gramme de caséine. La 1re colonne contient les numéros des espèces mises en expérience; la 2e, la totalité de l'azote obtenue par addition de l'azote soluble et de l'azote insoluble (quantités indiquées dans la 4e et la 3e colonne); enfin, la 5e indique l'azote soluble en 0/0 de la totalité et la 6e le rapport entre la partie insoluble et la partie soluble. Ce dernier chiffre nous semble plus important que celui de la colonne 5, car dans le calcul de ce dernier chiffre on tient compte de l'azote total qui n'est qu'une valeur obtenue secondairement. Néanmoins nous n'avons pas voulu laisser de côté ces valeurs, afin de mieux pouvoir

les comparer aux résultats obtenus par M. de Freudenreich.

Il faut encore mentionner que toutes nos cultures avaient une odeur faiblement butyrique, et que la caséine n'avait pas du

	Nos	AZOTE TOTAL	AZOTE INSOLUBLE	AZOTE SOLUBLE	SOLUBLE en 0/0 du total.	RAPPORT
16 jours.	1.....	0,10163	0,09407	0,00756	7,44	12,44
	2.....	0,10779	0,10246	0,00533	4,95	19,22
	3.....	0,11161	0,10433	0,00728	6,52	16,06
	4.....	0,10826	0,10359	0,00467	4,31	22,19
	5.....	0,10275	0,09827	0,00448	4,36	21,94
	Témoin..	0,011716	0,111	0,00616	5,26	18,02
28 jours.	1.....	0,10155	0,09873	0,00579	5,44	17,05
	2.....	0,10349	0,09873	0,00476	4,59	20,78
	3.....	0,10191	0,0978	0,00411	4,03	23,8
	4.....	0,10221	0,0981	0,0042	4,11	23,33
	5.....	0,10336	0,10013	0,00323	3,22	31
	Témoin..		0,09892			
48 jours.	1.....	0,10155	0,9547	0,00608	6	15,7
	2.....	0,10172	0,095	0,00672	6,61	14,35
	3.....	0,10415	0,09967	0,00448	4,3	22,25
	4.....	0,099	0,09527	0,00373	3,77	25,54
	5.....	0,09855	0,095	0,00355	3,6	26,76
65 jours.	1.....	0,09923	0,0968	0,00243	2,45	39,8
	2.....	0,09966	0,09593	0,00373	3,74	25,75
	3.....	0,0978	0,09313	0,00467	4,78	19,94
	4.....	0,09854	0,09593	0,00261	2,65	37,52
	Témoin..	0,09948	0,09687	0,00261	2,62	37,11
81 jours.	1.....	0,09742	0,09313	0,00429	4,4	21,71
	2.....	0,09631	0,0922	0,00411	4,27	22,43
	3.....	0,09818	0,09407	0,00411	4,58	22,89
	Témoin..	0,09844	0,0943	0,00411	4.18	22,95

tout changé d'apparence. Les filtrations se faisaient plus facilement vers la fin de l'expérience qu'au début. Enfin, les triages montraient que les bactéries ensemencées s'étaient bien développées sans contaminations, tandis que les flacons témoins étaient restés parfaitement stériles.

Les quantités solubilisées ne témoignent pas d'une sérieuse attaque de la caséine, telle que la suppose M. de Freudenreich, et telle qu'elle a réellement lieu dans un fromage d'Emmenthal.

On peut cependant se demander si nos bactéries lactiques ont été absolument sans action sur la caséine : nous croyons, vu les analyses faites à la fin de l'expérience et la concordance approximative entre les analyses des flacons ensemencés et des flacons témoins, qui montrent plutôt une diminution qu'une augmentation de la portion soluble, pouvoir répondre affirmativement à cette question. Mais dans ce cas nos bactéries, dont la multiplication et la vitalité ont été constatés par les triages, n'ont pu vivre qu'aux dépens de la caséine dissoute par l'eau, et par conséquent il est vraisemblable de supposer que dans les fromages elles ne vivent qu'aux dépens de la caséine déjà dissoute d'une manière ou d'une autre[1].

La diminution de l'azote est un phénomène déjà constaté dans les fromages; M. de Freudenreich, attribue cette perte à la formation de combinaisons volatiles, en particulier de l'ammoniaque. Nous avons examiné à ce point de vue nos cultures en nous servant du réactif de Nessler; nous n'avons pu y déceler même des traces d'ammoniaque. Cependant, comme il se pouvait que l'ammoniaque formée ait passé inaperçue à cause du vide où se trouvaient les cultures, nous avons tiré du vide trois cultures n° 5 de la quatrième série et les n°s 4 et 5 de la cinquième série. Après les avoir laissées séjourner 1-2 semaines dans l'air atmosphérique, nous obtenions avec le réactif de Nessler la réaction de l'ammoniaque.

Nos chiffres semblent indiquer également une faible diminution de l'azote dans les flacons témoins; mais pour se prononcer sur cette question, il faudrait que l'écart entre les résultats obtenus pour la partie soluble fût moins sensible et plus régulier.

Nous avons fait une autre série d'expériences en partant de

1. Voir aussi à ce sujet les études de Russell sur la galactase.

deux de nos bactéries lactiques (nos 2 et 3) que nous avons ensemencées sur une caséine modifiée par la caséase.

Pour obtenir cette dernière, nous avons filtré sur une bougie Chamberland une caséine sans lactose, délayée dans l'eau et très fortement attaquée par un *Tyrothrix*. Nous avons ajouté 10 c. c. du filtrat à des flacons qui contenaient 2 grammes de caséine sans lactose préparée comme il a été indiqué plus haut. nous avons placé les flacons dans une étuve à 35°.

Dans ces conditions, la caséine ne semblait pas se dissoudre. Cependant, en triturant les cultures plus tard, nous avons pu constater quelle s'était très ramollie.

Après un séjour de 16 jours dans l'étuve, nous avons ensemencé les bactéries lactiques, après quoi les cultures ont été placées dans le vide où elles sont restées jusqu'à la fin de l'expérience, qui a duré deux mois et demi.

Les analyses ont été faites comme pour les autres cultures.

Voici les résultats :

Nos	TOTAL	INSOLUBLE	SOLUBLE	SOLUBLE en 0/0 du total.	RAPPORT
2.....	0,1205	0,085	0,0355	29,46	2,39
3.....	0,11635	0,08455	0,0318	27,33	2,66
Témoin.....	0,11955	0,08455	0,035	29,28	2,42

Ces chiffres, qui indiquent les quantités d'azote en grammes par gramme de caséine, montrent aussi d'une manière évidente que les bactéries lactiques n'ont pas attaqué la caséine.

Une troisième expérience a été faite avec une bactérie lactique ensemencée sur une caséine préparée de la manière suivante :

Sur une caséine sans lactose préparée comme cela a été indiqué plus haut, nous avons ensemencé un Tyrothrix ; quand celui-ci eut attaqué la caséine à un tel point que chaque morceau était ramolli sans toutefois être liquéfié, la caséine fut séchée pour être conservée. Cette caséine fut mise, à raison de 2 grammes par expérience, dans de petits flacons contenant 20 grammes d'eau de conduite : ensuite le tout fut stérilisé 3 jours de suite à 120°. Sur la caséine ainsi préparée, nous avons ensemencé une bactérie lactique, et nous avons mis cette culture dans le

vide. L'analyse se fit exactement comme dans la première expérience. En voici le résultat :

Nos	TOTAL	INSOLUBLE	SOLUBLE	SOLUBLE en 0/0 du total.	RAPPORT
2.....	0,12271	0,09065	0,03206	26,13	2,83
Témoin.....	0,11994	0,08844	0,0315	26,27	2,81

Par ces chiffres on voit de nouveau que la bactérie lactique n'a pas du tout pu attaquer la caséine.

Pour le moment, nous nous bornons à ces expériences; mais nous nous réservons de revenir plus tard sur le même sujet.

Si maintenant nous récapitulons nos résultats, il en ressort jusqu'à l'évidence que des bactéries lactiques isolées d'un fromage d'Emmenthal ne sont pas capables de dissoudre la caséine coagulée, et par conséquent il nous semble qu'il est prouvé que M. de Freudenreich (s'il n'a pas travaillé sur des bactéries lactiques toutes spéciales) ne peut avoir raison quand il dit[1] « que ce sont les bactéries lactiques qui jouent le rôle prépondérant, sinon exclusif, dans la maturation du fromage d'Emmenthal ».

On pourrait objecter à notre argumentation que nous nous sommes servi d'une caséine lavée et chauffée jusqu'à 120°, et qu'il se pourrait qu'une caséine ainsi traitée soit si différente de la caséine d'un fromage, que nos résultats n'auraient qu'une valeur relative. Cependant la même objection pourrait être faite à toutes les expériences faites sur le lait stérilisé. La valeur de cette objection reste à démontrer.

1. *Centralblatt f. Bact.*, 1895, p. 349.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

15me ANNÉE FÉVRIER 1901 N° 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LES THÉORIES PARASITAIRES DU CANCER

PAR LE Dr A. BORREL

(Avec les planches III, IV et V.)

Jadis on désignait sous le nom de *tumeurs* les productions pathologiques les plus diverses, et ce n'est que peu à peu, par les progrès des études microbiologiques, que charbon, morve, tubercule, lèpre, actinomycose sont sortis du cadre confus des tumeurs pour entrer dans le domaine mieux défini des maladies infectieuses.

Aujourd'hui encore, la classe des tumeurs comprend des néoplasies très différentes par leur structure histologique, leur malignité, et certainement aussi par leur cause étiologique. — L'expression vague et vulgaire de « cancer » ou tumeur cancéreuse ne correspond à aucune production bien définie; elle sert à désigner toute tumeur maligne, récidivante, susceptible de généralisation, et capable d'entraîner la mort par une cachexie plus ou moins précoce : sarcome, épithéliome, carcinome, avec leurs diverses variétés. — De tout temps, les tumeurs malignes ont appelé l'attention des pathologistes par leur caractère *infectant*, par les métastases qu'elles provoquent dans les ganglions lymphatiques ou les organes internes à la manière des maladies virulentes : on a toujours comparé le cancer à la tuberculose : on a décrit la cellule cancéreuse à côté de la cellule tuberculeuse : on a admis l'hérédité cancéreuse au même titre que l'hérédité tuberculeuse, et de même que jadis on expliquait la genèse des tubercules par une déviation pathologique des éléments des tissus, beaucoup d'anatomo-pathologistes veulent encore expli-

quer l'évolution des tumeurs cancéreuses par quelque désorientation cellulaire spontanée.

Pourtant les observations cliniques les plus récentes semblent bien démontrer qu'il y a des pays, des rues, des maisons à cancer; le caractère contagieux, épidémique même, de certaines formes de cancer semble bien établi, et depuis que le rôle des micro-organismes dans la genèse des maladies infectieuses a été mis en évidence, on a voulu trouver le *microbe du cancer :* expression particulièrement impropre lorsqu'on l'emploie au singulier, car il est bien évident que les diverses variétés du cancer ne pourront jamais être expliquées par une cause étiologique unique; il doit y avoir *des* microbes du cancer et il peut exister des tumeurs sans microbes.

Les premiers essais de démonstration, au début de la bactériologie, n'ont pas été heureux, et les observations de Scheuerlen, Rappin, Koubassof, etc., qui avaient cru isoler, cultiver, inoculer le microbe du cancer, sont tombées dans l'oubli : il s'agissait de bactéries banales.

I

THÉORIE COCCIDIENNE

Il y a quelque dix ans, la question du parasitisme des tumeurs cancéreuses a pris une orientation toute différente, et on a voulu incriminer comme parasites, dans les tumeurs épithéliales, non plus des bactéries, mais des Sporozoaires.

Les cancers épithéliaux sont surtout caractérisés par la prolifération excessive d'une cellule du type épithélial : épithélium de revêtement ou épithélium glandulaire; cette cellule se multiplie dans les foyers métastatiques et dans les ganglions lymphatiques avec le type de la tumeur initiale. Or, on ne connaît pas, jusqu'ici du moins, de bactérie capable de causer, soit par sa présence dans la cellule, soit indirectement par une action à distance au moyen d'une toxine, la prolifération anormale des épithéliums; les bactéries connues, les champignons, lorsqu'ils donnent naissance à des productions pathologiques, déterminent la néoformation ou plus exactement l'accumulation de cellules du type mésodermique (cellules épithélioïdes) et donnent ou des granulomes ou des tubercules.

D'autre part, on connaissait depuis longtemps des parasites appartenant au groupe des Sporozoaires, des Coccidies, qui vivent de préférence dans les cellules épithéliales, qui provoquent l'hypertrophie de ces cellules et souvent, chez certains animaux, donnent naissance à de véritables tumeurs : adénome villeux des canaux biliaires du lapin par le *Coccidium oriforme*, adénome de l'intestin par la coccidie du mouton (Nocard).

L'hypothèse d'un Sporozoaire, d'une coccidie parasite des cancers épithéliaux était séduisante ; on a cherché à l'établir en se basant surtout sur des analogies morphologiques.

Neisser [1] le premier, en 1888, avait décrit des coccidies dans les petites tumeurs inoculables qui caractérisent l'acné varioliforme ou *molluscum contagiosum* de l'homme. Pour lui, les figures si particulières de dégénérescence protoplasmique qu'on trouve dans ces boutons épithéliaux, et qui aboutissent à la formation de globes cornés expulsés dans la cavité de la petite tumeur, devaient être considérés comme des coccidies typiques ; mais les figures de l'auteur n'entraînent pas la conviction, et l'étude de cette question, entreprise par de nombreux observateurs, a montré l'inexactitude de cette interprétation. D'ailleurs, il ne s'agit pas ici de tumeurs cancéreuses.

Pfeiffer [2] parle de coccidies pour la première fois dans le cancer en 1888, mais les figures qu'il donne à l'appui de cette hypothèse n'ont rien qui puisse entraîner la conviction.

Avec les travaux de l'école de Malassez, de Darier [3], de Wickham [4], en 1889, la question est nettement posée, et ces auteurs décrivent comme coccidies, dans le tissu épithélial des tumeurs, des corps ronds intra ou extra-cellulaires, avec une membrane réfringente à double contour, qu'ils comparent aux formes enkystées de la coccidie du lapin.

Darier les signale dans une maladie cutanée spéciale, connue depuis sous le nom de psorospermose folliculaire végétante ; Wickham les décrit avec détail dans la maladie de Paget ;

1. Neisser, Ueber das Epithelioma (sive Molluscum contagiosum), *Zeitschrift f. Dermatologie*, 1888.

2. Pfeiffer, Beiträge zur Kenntniss der pathogenen Gregarinen, *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. III et V, 1888.

3. Darier, De la psorospermose folliculaire végétante, *Archiv. de Dermatologie*, 1889, n° 7, *Société de Biologie*, 1889, avril, p. 294.

4. Wickham, Maladie de Paget, Thèse de Paris, 1890.

Vincent[1] les signale avec une méthode de coloration spéciale dans un cas d'épithélium pavimenteux.

Les descriptions très explicites données des pseudo-parasites ont permis d'établir rapidement et d'une façon définitive leur vraie nature : il s'agissait non pas de parasites, mais de cellules épithéliales à évolution particulière [2].

Les caractères assignés au noyau de ces formations suffisent pour éloigner l'idée d'un parasite sporozoaire : on a affaire à un noyau de cellule épithéliale. — La membrane d'enveloppe, qui donne à ces cellules l'apparence de kystes étrangers au tissu, résulte ordinairement du tassement des filaments de la cellule engainante ou des cellules voisines malpighiennes, suivant qu'on a une formation endogène ou une invagination cellulaire.

A l'intérieur du pseudo-kyste, sphérique ou ovalaire, se trouve une masse protoplasmique entourant le noyau, et rattachée à la capsule par une série de filaments radiaires qui signent encore mieux la véritable nature du pseudo-parasite. De pareilles cellules évoluent, dégénèrent au sein du tissu épithélial, et peuvent fournir les apparences les plus variées.

Le parasite, dans cette première période, était une cellule épithéliale.

L'attention étant appelée du coté des Sporozoaires, de nombreux observateurs ont décrit comme parasites tout ce qui leur paraissait un peu anormal dans les coupes : le *Rhopalocephalus carcinomatosus*, de Korotneff [3], date de la fin de cette période, et n'a pas trouvé un accueil favorable de la part des pathologistes.

Russell [4], en 1890, avait aussi signalé, comme formes parasitaires dans les tumeurs, des amas de boules sphériques de dimensions variables, situées dans le stroma conjonctif et caractérisées par un affinité spéciale pour les matières colorantes, d'où le nom de *corpuscules à fuchsine*.

Ces boules, qu'il est facile de retrouver dans des lésions pathologiques diverses, cancer, sarcome, syphilis, tubercule, etc.,

1. Vincent, Sur la présence d'éléments semblables aux psorospermies dans un cas d'épithélioma pavimenteux, *Soc. de Biol.*, 1890.

2. Borrel, Sur la signification des figures décrites comme coccidies dans l'Epithélioma, *Arch. de méd. expérimentale*, 1890, t. II.

3. Korotneff, *Centralb. f. Bact. u. Parasit*, Bd. XIII, 1893.

4. Russell, The characteristic organism of cancer. *Brit. med.* J l., 1890, n° 1562.

ne montrent aucune structure, et donnent tout à fait l'impression de boules de dégénérescence hyaline. — Nous verrons qu'elles ont été interprétées d'abord comme des Sporozoaires, puis comme des levures.

Dans une deuxième période qui commence avec le travail de Thoma[1], les figures données à l'appui de la théorie coccidienne sont d'une tout autre nature.

Il s'agit d'inclusions intra-cellulaires, de corps ronds, isolés ou multiples, dans l'intérieur de la cellule cancéreuse; on les trouve surtout dans les épithéliums du type glandulaire, ils sont rares dans les tumeurs du type malpighien, et on a voulu les rattacher à des formes déjà décrites depuis longtemps et désignées par Virchow sous le nom de cellules physaliphores.

Ces corps ronds ou mieux ces vacuoles intra-cellulaires, suivant la technique employée, ont été plus ou moins bien caractérisés: on a, de tous les côtés, cherché à établir leur nature parasitaire, et essayé de décrire des stades d'évolution analogues à ceux que l'on connaissait chez les Sporozoaires. — Il y a eu de nombreux malentendus dans la discussion, et si les partisans du parasitisme n'ont jamais pu établir la nature exacte des corps qu'ils décrivaient comme parasites, leurs adversaires, dans leurs critiques, ont souvent visé des figures qui jamais n'ont été décrites comme Sporozoaires.

A cette période correspondent les travaux de Thoma, de Nils Sjobring[2], de Soudakewitch[3], de Foa[4], de Ruffer[5] avec ses collaborateurs Walker et Plimmer, de Podwyssotzky[6], etc.

Vues rétrospectivement, les formations invoquées par les auteurs de cette seconde période ne nous montrent que des analogies superficielles avec les coccidies. Il faut bien avouer que la plupart s'expliquent très bien par des modifications

1. Thoma, Ueber eigenartige parasitare Organismen in den Epithelzellen der Carcinome, *Forstchr. d med.*, 1889, Bd. VII page 413.

2. Sjöbring, *Fortsch. d. Med.*, 1890, Bd. VIII, pag. 529.

3. Soudakewitch, *Annales Inst. Pasteur*, 1892, t. VI, pages 145 et 545.

4. Foa, Ueber die krebsparasiten, *Centr. f. Bact.*, 1892, B. XII, n° 6.

5. Ruffer, *Brit. med. Journal*, 1892, page 993.

Ruffer et Plimmer, Sur le mode de reproduction des parasites du cancer, *Soc. de Biol.*, 1893, page 836.

6. Podwyssotzki et Sawtchenko, Ueber Parasitismus bei Carcinomen, *Centr. f. Bact.*, 1892, Bd. XI, page 491.

protoplasmiques, en rapport avec des phénomènes de sécrétion, et aboutissant à la formation de vacuoles intra-cellulaires isolées ou multiples ; elles donnent souvent des figures très compliquées et régulières, simulant des formes de division d'un parasite. — Dans ces vacuoles se trouvent des substances à divers états de condensation, et, le plus souvent, il s'agit de mucus.

Les caractères de coloration de ces pseudo-parasites, d'après Foa, Soudakewitch, etc., la métachromatie après l'action de la safranine ou de la safranine-hématoxyline, caractérisent la formation des substances muqueuses.

Ruffer, avec une méthode de coloration différente, par le Biondi-Heidenhain, a voulu surtout mettre en évidence un parasite dans l'intérieur de ces vacuoles : il a cherché à établir la présence d'un noyau caractéristique d'un protozoaire, mais ce corps central, pseudo-amibe, n'est pas toujours présent, il a été insuffisamment caractérisé et mal défini jusqu'à la publication d'un travail important de Sawtchenko[1] en 1895.

Ce travail marque une nouvelle période dans la question des parasites du cancer, parce que, grâce à une technique excellente et à un matériel favorable, l'auteur a pu étudier beaucoup mieux que ses prédécesseurs un certain nombre d'inclusions cellulaires qu'il a considérées d'abord comme des formes parasitaires, et qui, il faut bien le reconnaître, sont très comparables aux stades jeunes et intra-cellulaires de la coccidie du lapin.

Pour Sawtchenko, le parasite se présente, le plus souvent, sous la forme d'un petit corps logé dans une vacuole de la cellule cancéreuse ; souvent cette vacuole contient du mucus métachromatique, et le parasite est la cause de la dégénération partielle de la cellule.

Le parasite est constitué par un petit amas de protoplasma sans membrane d'enveloppe, il montre un noyau semblable au noyau des sporozoaires, avec un karyosome unique. Ce parasite est capable d'évolution ; il grossit, le noyau se divise, et autour de chaque nouveau grain chromatique s'isole une portion de protoplasma ; puis chaque nouveau parasite se loge dans une vacuole, et une même cellule peut être infectée par

1. Sawtchenko, *Bibliotheca Medica*, 1895, Abth. D. Heft IV.

un grand nombre de parasites ; il s'agirait de stades analogues à ceux que l'on observe dans l'évolution endogène d'une coccidie (stade à *mérozoïtes* de Simond, *schizogonie* de Schaudinn : Planche III, fig. 1 à 5).

Ce travail, irréprochable au point de vue technique, est certainement la tentative la plus sérieuse faite pour démontrer la présence de Sporozoaires dans le cancer. Les parties centrales de certaines des figures de Soudakewitch. Ruffer correspondent probablement aux parasites de Sawtchenko, mais la technique mieux appropriée qu'a employée ce dernier savant lui a permis de mieux illustrer la ressemblance des figures qu'il décrit avec les stades d'évolution d'un Sporozoaire ; ici il ne s'agit pas d'une dégénérescence banale, ni d'un processus de désintégration cellulaire ; il ne peut être question de phénomènes de chromatolyse, de destruction de leucocytes ayant pénétré dans l'intérieur d'une cellule cancéreuse. La cellule est en parfait état ; tout semble parler en faveur d'un corps amiboïde parasite, de quelque chose de vivant.

Pourtant, ici encore, il n'y a probablement pas de parasites ; j'ai pu, sur des préparations plus favorables, suivre l'évolution de ces corps, me convaincre qu'il s'agit là encore d'une évolution atypique d'un élément de la cellule cancéreuse, la *sphère attractive* ou mieux l'*archoplasma*, pour employer un terme de cytologie qui nous permettra de rattacher cette évolution à une évolution normale.

Lorsqu'on étudie la formation du spermatozoïde chez le cobaye, on constate dans les spermatocytes de premier ordre, à côté du noyau, une sphère archoplasmique nettement individualisée, dans laquelle se trouvent un ou deux centrosomes en diplocoques. (Pl. III, fig. 6 *a*.)

Par la fixation au Flemming, et coloration au rouge de Magenta suivi de picro-indigo-carmin, le protoplasma de la sphère est coloré en bleu foncé et les centrosomes sont colorés en rouge. — Puis apparaissent dans la sphère, par voie de division, une grande quantité de corpuscules centrosomiques qui ont les réactions colorantes des centrosomes initiaux (fig. 6 *b*, *b'*, *c*). Plus tard, ces corpuscules, toujours inclus dans l'archoplasma ou *idiosome* (Meves), grossissent et leur nombre diminue : il se fait comme une fusion qui aboutit à un gros corps chromatique

unique, entouré par une auréole d'archoplasma coloré en bleu (fig. 6 *d.*) ; c'est là l'origine de la coiffe du spermatozoïde.

Déjà à ce moment, le cil vibratile inséré sur un des centrosomes a fait son apparition ; l'idiosome vient s'appliquer contre le noyau (fig. 6 *e*), et parait l'attirer fortement : des prolongements archoplasmiques, émis par l'idiosome, isolent le noyau dans la cellule (*e*), tandis que le centrosome porteur du cil vibratile vient s'accoler à l'autre pôle du noyau, et le spermatozoïde avec sa coiffe est comme énucléé de la cellule mère par un mécanisme sur lequel il est inutile d'insister ici. (Fig. 6 *f*, *g*.)

Il y a donc là toute une évolution de l'archoplasma, et nos observations faites avec des méthodes de coloration différentes de celles de Meves[1], confirment absolument celles de ce dernier.

Bröman[2] a, tout récemment, signalé la multiplication des centrosomes dans l'idiosome des grandes cellules spermatiques de *Bombinator igneus*.

Heidenhain[3], dans les grandes cellules à noyau polymorphe de la moelle osseuse du lapin, a signalé le développement considérable des groupes centrosomiques ; il constate jusqu'à 90 et 100 grains centrosomiques. (Pl. III, fig. 7.)

Dans les ovules de jeune cobaye, le corps vitellin représente aussi ce même idiosome, et j'ai pu y mettre en évidence les centrosomes.

Tous ces faits, tirés de l'évolution normale, nous montrent que, dans la cellule, certaines portions peuvent subir une évolution très compliquée sur laquelle l'attention des cytologistes commence à être appelée. (Voir à ce sujet la revue très complète de Prenant, *Journal de l'Anatomie*, 34 et 35.)

L'archoplasma et le centrosome paraissent jouer en particulier un rôle très important dans les phénomènes de sécrétion cellulaire (Zimmermann).

Nous allons trouver des faits de même ordre et plus compliqués encore dans l'évolution de certaines cellules cancéreuses.

Les figures dont il va être question correspondent incontestablement aux parasites de Sawtchenko, et j'ai reproduit, Pl. III, fig. 1, 2, 3, 4, 5, les dessins de l'auteur, pour faciliter la compa-

1. Meves, *Archiv. f. Micr. Anat.* Bd. LIV, 1899.
2. Bröman, *Anat. Anzeiger*, 1900.
3. *Archiv. f. mic. Anat.* Bd. XVIII, 1894.

raison. (Les nécessités du tirage des planches ont modifié légèrement la coloration des figures reproduites.)

Pour étudier à ce point de vue un peu délicat les cellules cancéreuses, il faut de toute nécessité se préoccuper d'une fixation des éléments aussi parfaite que possible, et des fragments de la tumeur doivent être immergés dans les fixateurs aussitôt après l'ablation.

Le liquide de Flemming ou le liquide de Hermann peuvent être employés ; j'ai eu de bons résultats avec le fixateur suivant :

Eau	350 grammes.
Acide osmique	2 —
Dissoudre et ajouter :	
Acide chromique	3 grammes.
Chlorure de platine	2 —
Acide acétique	20 —

La fixation est toujours meilleure lorsqu'on opère à basse température. Les fixateurs à base d'acide osmique ont un pouvoir de pénétration très faible ; les couches cellulaires fixées convenablement sont très peu nombreuses, il est facile de s'en rendre compte sur les coupes ; on augmente la zone de fixation en immergeant les fragments dans le fixateur maintenu à la glacière.

Une expérience comparative de fixation à 0°, 15°, 30°, 45° et 60° m'a montré que, pour les fixateurs osmiques, on avait tout avantage à opérer au voisinage de 0°.

Dans tous les cas, c'est toujours près de la surface, là où le fixateur agit d'abord, que les résultats sont les meilleurs.

La méthode de coloration qui donne les meilleurs résultats est la suivante :

Les coupes étalées sur la lame sont colorées d'abord par le rouge Magenta ; on peut employer ou une solution aqueuse, ou une solution anilinée, ou une solution phéniquée ; avec une solution phéniquée, il suffit de quelques minutes (10-15) surtout si on opère à chaud (à 50° par exemple). On traite ensuite par le picro-indigo-carmin[1] (5 minutes) ; on lave rapidement à l'eau, on déshydrate et on décolore le rouge de Magenta par l'essence

1. Mélange de 2 volumes d'une solution forte de carmin d'indigo à 1 volume d'une solution saturée d'acide picrique.

de girofle, en suivant au microscope les progrès de la décoloration.

En examinant les coupes les plus superficielles et par suite les mieux fixées, lorsqu'on a la bonne fortune de tomber sur une tumeur qui contient des pseudo-parasites, on peut bien étudier la genèse des formes qui sont en question.

Souvent à côté du noyau, surtout dans les grandes cellules un peu hypertrophiées, on peut mettre en évidence la sphère attractive colorée en bleu foncé sur le protoplasma clair ; elle contient un ou deux centrosomes (Pl. IV, fig. 1) — (comparer avec les spermatocytes du cobaye, Pl. III, fig. 6 *a*.) Ici, il n'est pas question de parasite, et c'est là le point de départ important non vu par Sawtchenko. Cette sphère peut contenir un plus ou moins grand nombre de corps centraux disposés en chaînettes (Pl. IV. fig. 2) ou en amas irréguliers. Une même cellule peut contenir 20 et 30 petits centrosomes, et dans les préparations on trouve ainsi beaucoup de cellules de ce type.

Le processus qui conduit aux pseudo-parasites est toujours le même : c'est un processus de vacuolisation. Tantôt c'est la sphère tout entière qui s'isole dans le protoplasma de la cellule ; on a alors, suivant les dimensions de la sphère et du corps central, suivant le nombre des centrosomes, une pseudo-amibe plus ou moins grande, contenant soit un karyosome et un noyau unique, soit un noyau fragmenté. (Pl. IV, fig. 3, fig. 4, etc.)

Le stade le plus fréquent est celui d'une pseudo-amibe unique, avec noyau unique dans une vacuole à côté du noyau de la cellule cancéreuse. Les stades de multiplication du noyau dans le pseudo-parasite sont plus rares.

Il peut se faire aussi une individualisation de l'archoplasma autour de chaque grain centrosomique, lorsqu'il y a eu d'abord multiplication de centrosomes dans la sphère avant la vacuolisation. (Pl IV. fig. 5.)

Tantôt la vacuolisation de l'archoplasma est partielle et ce sont là les cas les plus intéressants et les plus démonstratifs (voir Pl. III. fig. 8). A côté du noyau dans la cellule, l'archoplasma est coloré en bleu foncé et se relie par des prolongements fins au protoplasma ; 3 vacuoles, développées dans la sphère même, montrent à leur intérieur des pseudo-amibes en voie de développement, et de dimensions variables ; entre les vacuoles, dans

l'archoplasma, se voient très bien les grains centrosomiques non encore individualisés.

On pourrait objecter qu'il s'agit là de parasites, d'amibes, qui de préférence vont se loger et se développer dans l'archoplasma. La figure 4, Pl. IV, éloigne cette interprétation, puisque ici c'est la sphère tout entière, avec ses prolongements pseudopodiques, qui s'est entourée d'une vacuole.

Les figures 8, Pl. IV et 11, Pl. V, nous expliquent très bien le mode de formation de ces pseudo-parasites, et l'on voit, dans une cellule, un très grand nombre de grains centrosomiques tous égaux ou à peu près, dont une partie reste agglomérée en staphylocoques, tandis que déjà beaucoup de grains sont entourés de toutes petites vacuoles naissantes.

Dans la figure 8, la gradation est nettement marquée, et on voit le développement progressif des centrosomes; il y en a de tout petits à peine différenciés, il y en a un qui est déjà relatiment gros (2 μ environ).

Il s'agit bien de quelque chose de vivant et qui se développe, mais il ne saurait être question de parasites.

On arrive à des figures tout à fait séduisantes en faveur de l'hypothèse parasitaire, et la figure 12, Pl. V, représente à s'y tromper une cellule infectée par 5 jeunes amibes, que rien au microscope ne peut différencier des stades jeunes de la coccidie du lapin (forme en œil de pigeon, décrite par von Leyden); mais ici encore la chaînette centrale des centrosomes est là pour signer la véritable origine de ces formations.

Les figures 13, 14, 15 et 16 sont du même type, et je dois avouer que pendant longtemps je les ai interprétées comme des formes parasitaires évidentes ; par exemple, la fig. 10, Pl. IV, représente à s'y méprendre un des stades de multiplication des coccidies les plus typiques.

L'étude minutieuse des préparations m'éloigne complètement de l'interprétation parasitaire au sujet de toutes ces figures, et je crois qu'il s'agit ici d'une évolution très compliquée de l'archoplasma et des corps centraux dans certaines cellules cancéreuses.

Les réactions colorantes identiques employées soit dans l'étude de la cellule cancéreuse, soit dans l'étude des cellules testiculaires permettent d'interpréter d'une façon qui nous

paraît satisfaisante les figures pseudo-parasitaires si remarquables décrites par Sawtchenko.

Entre l'idiosome du spermatocyte, entre le corps vitellin de l'ovule du cobaye, l'archoplasma des cellules sécrétantes et l'archoplasma de la cellule cancéreuse, il y a des rapports évidents. Dans le testicule, l'évolution aboutit à une formation normale ; dans la cellule cancéreuse, nous ne connaissons encore ni la cause ni la fin de cette évolution, qui au point de vue morphologique aboutit à des corps chromatiques énormes donnant l'impression de substances en dégénérescence. (Pl. V, fig. 18, 19, 20, 21).

La critique que nous venons de faire des travaux qui ont voulu établir la présence de Sporozoaires dans les tumeurs cancéreuses ne doit pas empêcher les recherches dans cette voie, elle ne doit pas nécessairement faire abandonner une si séduisante hypothèse. Elle montre simplement que la question est très compliquée, qu'il faut tenir grand compte des particularités de l'évolution de la cellule cancéreuse avant d'affirmer la présence de Sporozoaires dans les tumeurs.

Peut-être de nouvelles recherches dans cette voie seront-elles plus démonstratives.

Récemment Leyden et Schaudinn[1] ont trouvé, dans deux ascites cancéreuses (tumeurs abdominales), une amibe très bien caractérisée au point de vue zoologique, mais ils n'ont pu démontrer que la *Leydenia gemmipara* ait joué un rôle actif dans la production de la tumeur.

Schaudinn[2] lui-même, dans un travail postérieur, se prononce très nettement contre la théorie parasitaire et la présence de Sporozoaires dans les cellules cancéreuses.

Plus récemment encore Nils Sjöbring[3] a pu extraire d'une tumeur et cultiver un parasite qu'il range dans le groupe des Rhizopodes. Ces travaux attendent une confirmation.

II

THÉORIE BLASTOMYCÉTIENNE

Dans ces dernières années, à côté de la théorie parasitaire

1. Leyden et Shaudinn, *Sitzunsber. Akad. Wissensch, Berlin.*
2. Schaudinn, *Zool. Jahrb. Abth. f. Anat.*, XIII, 1900.
3. Nils Sjöbring, *Centralbl. f. Bakt.*, Abth. I, 27, 1900.

du cancer par les Sporozoaires, a pris naissance la théorie Blastomycétienne, et nous allons voir que les figures, interprétées par certains comme des coccidies ont été considérées par d'autres comme des levures. Les tumeurs cancéreuses, sarcome ou épithélioma, seraient dues au développement de levures.

La première observation qui a montré chez l'homme le rôle pathogène d'une levure est celle de Busse [1].

Il s'agissait d'une tumeur ou plutôt d'un abcès du tibia, « Sarcome ramolli », a d'abord dit inexactement l'auteur, et dans cette tumeur, Busse a vu au microscope une levure, l'a cultivée et inoculée. L'inoculation aux animaux, cobaye, lapin, reproduit des tumeurs, dans le sens le plus général du mot, et elles sont constituées en majeure partie par des cellules de levure, déterminant une réaction inflammatoire et l'accumulation de cellules lymphatiques. L'auteur signale la ressemblance des cellules de levure avec les figures décrites comme coccidies par Darier, Wickham, etc. Nous savons qu'il s'agit d'une ressemblance tout à fait grossière : ce sont des éléments arrondis.

De même la tumeur produite n'a aucun rapport avec une tumeur cancéreuse. C'est ce qu'a très bien montré Curtis [2], qui a eu l'occasion d'étudier un cas semblable, et a aussi isolé et inoculé une levure pathogène pour le cobaye, le rat, le lapin, etc. Toujours les tumeurs produites sont des granulomes, et la maladie est une saccharomycose.

San Felice, Roncali, etc., ont soutenu, dans de nombreux travaux, cette théorie blastomycétienne du cancer.

Ils veulent l'appuyer : 1° sur la présence d'éléments semblables aux levures dans les coupes des tumeurs; 2° sur l'obtention de cultures de levures des cancers; 3° sur les effets de l'inoculation aux animaux.

I. — Ces savants, partisans des levures, ne se préoccupent pas beaucoup de l'étude précise des formes microscopiques. Tout ce qui est rond et muni d'une capsule est facilement rangé dans le groupe des Blastomycètes; ils acceptent comme levures et les figures de Darier et celles de Thoma, Soudakewitch, Ruffer, Sawtchenko, en y joignant les corps à fuchsine de Russell.

1. Busse, Ueber Saccharomycosis hominis, *Virchow's Archiv.*, Bd. CXL, S. 23. Busse, Ueber parasitare Zelleinschlüsse. *Centralb. f. Bact.*, Bd. XVI, S. 175.
2. Curtis, Saccharomycose humaine, ces *Annales*, 1896.

Il y a là une infinie variété de formes bien connues maintenant, d'origines très diverses, et qu'il est tout à fait impossible de considérer en bloc comme des levures.

D'ailleurs, *a priori*, il serait très difficile d'expliquer le siège intra-cellulaire d'une levure dans une cellule épithéliale; on comprend très bien la pénétration d'une coccidie ou d'une amibe dans une cellule épithéliale, mais on ne peut admettre la pénétration d'une levure.

La théorie blastomycétienne est admise par Plimmer[1] dans un récent travail, et cet auteur interprète comme levures les figures que jadis il avait décrites comme coccidies.

Sawtchenko[2] lui-même, dans un mémoire paru en 1898, passe à la théorie des levures parasites, et explique par la levure toutes ses figures d'amibes, de corpuscules-germes que nous venons de discuter.

A notre avis, *au point de vue morphologique*, les diverses variétés d'inclusions que nous avons passées en revue ne sauraient être considérées comme des levures, et la démonstration au microscope reste tout entière à faire. *S'il y a des levures dans les tumeurs cancéreuses, elles ne sont certainement pas dans les cellules épithéliales.*

II. — Les partisans de la théorie blastomycétienne réalisent facilement des cultures de levures extraites de tumeurs cancéreuses, mais la plupart des observateurs n'ont pas confirmé cette opinion, et lorsqu'on prend des précautions d'asepsie rigoureuse, lorsqu'on opère sur des pièces fraîches, on n'obtient pas de cultures. Maffucci et Sirleo[3] ont fait de nombreuses recherches dans ce sens; ils ont en effet quelquefois obtenu des colonies de levures, mais ils les ont considérées comme des impuretés, puisque des plaques de contrôle exposées en même temps à l'air du laboratoire ont aussi donné des colonies de levures.

III. — Les partisans de la théorie blastomycétienne s'appuient encore et surtout sur le résultat des inoculations aux animaux; cette inoculation a mis en évidence le rôle pathogène considérable des levures.

Busse, Curtis, en inoculant des levures provenant de saccha-

1. Plimmer, *Cent. f. Bact. Abth*, I, 1899.
2. Sawtchenko, *Arch. russes de Path.*, 1898.
3. Maffucci et Sirleo, *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XXVIII.

romycoses humaines, ont obtenu des effets pathogènes, et la mort des animaux, avec production de tumeurs au lieu d'inoculation et dans différents points de l'organisme. Chez le rat, les tumeurs produites par inoculation péritonéale deviennent énormes, mais il ne s'agit nullement de tumeurs cancéreuses. L'examen microscopique montre, soit dans la tumeur primaire, soit dans les nodules de généralisation, la structure des granulomes; il est facile de mettre en évidence, dans les coupes, des levures parfaitement reconnaissables, et les figures obtenues diffèrent totalement des figures invoquées comme levures dans les cancers. Par la culture, on isole ces levures.

L'accumulation de cellules épithélioïdes, qui traduit la réaction de l'organisme, a, dans certains cas, pu faire penser à une néoformation épithéliale.

Suivant la levure, suivant l'organisme inoculé et le lieu de l'inoculation, les réactions sont un peu différentes, mais très généralement les tumeurs obtenues sont du type mésodermique, le tissu réactionnel peut même s'organiser, donner de véritables fibromes, chondromes.

Il y a là des faits très intéressants, mais qui à notre avis n'ont rien à voir avec la question du cancer.

San Felice obtient de pareilles tumeurs avec une levure, isolée d'un citron ou de fruits variés.

Podwyssotzky a obtenu, en inoculant des spores de *Plasmodiophora brassicæ*, des tumeurs qui ressemblent superficiellement à des endothéliomes.

Bosc, en inoculant des spores de *Monocystis* du lombric, a obtenu aussi des néoformations qu'il veut rapprocher des tumeurs cancéreuses.

Il est probable qu'en inoculant ainsi des corps variés difficiles à résorber, on déterminerait des tumeurs ou plutôt des pseudo-tumeurs résultant de l'évolution des cellules réactionnelles.

San Felice[1] surtout a soutenu, dans de nombreux travaux, le rôle pathogène des blastomycètes.

Deux voies peuvent être suivies, dit-il, *pour mettre en évidence le caractère infectieux des tumeurs malignes* :

1° La voie directe : partir d'une tumeur cancéreuse, inoculer

1. San Felice, *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XXI, XXII, XXIX.

des fragments, obtenir des cultures, reproduire la tumeur initiale. De ce côté aucun résultat n'a été obtenu avec certitude;

2° La voie indirecte, et celle-ci lui paraît meilleure :

Chercher et isoler des levures dans le milieu ambiant, les inoculer, produire chez les animaux des tumeurs cancéreuses.

Une espèce de blastomycète, isolée de la surface d'un fruit, le *Saccharomyces neoformans*, a surtout été étudiée par San Felice. Elle est pathogène pour un grand nombre d'espèces animales, et donne très ordinairement chez le rat, le cobaye, etc., ou une infection rapidement mortelle, ou la production de granulomes. Dans ce cas la levure est facilement reconnaissable au microscope, elle abonde dans les préparations et se cultive facilement.

Les mêmes tableaux pathologiques sont obtenus avec la levure de Busse, Curtis, Plimmer, etc.

San Felice considère les résultats de l'inoculation au chien comme tout à fait démonstratifs.

Sur 59 chiens inoculés, 3 ont montré une production de tumeurs.

Le premier cas publié a été observé chez une chienne sacrifiée 4 mois après l'inoculation. Il y avait, à l'autopsie, une tumeur de la mamelle et des noyaux métastatiques dans le rein. Les dessins de l'auteur montrent qu'il s'agit d'un processus granuleux, interstitiel, d'une saccharomycose. Les levures abondent soit dans le tissu, soit dans les cellules épithélioïdes. Au point de vue morphologique, San Felice veut identifier ses levures avec les figures décrites jusqu'à lui comme coccidies. Cette opinion n'est pas soutenable.

Le deuxième cas, signalé déjà en 1896, et décrit en détail en 1898, est celui d'une chienne inoculée depuis 10 mois avec une culture de *Sacch. neoformans*, et morte cachectique. Il y avait une tumeur au point d'inoculation dans la mamelle, et des métastases dans les ganglions lymphatiques. Rien dans les autres organes. Les préparations montrent qu'il s'agit incontestablement d'un adéno-carcinome. Le tableau microscopique diffère totalement du premier cas publié, et ne peut lui être comparé.

Malheureusement, on ne trouve pas, dans les coupes, de figures que l'on puisse avec certitude considérer comme levures; les cultures sont restées stériles.

Le troisième cas publié est celui d'un chien inoculé dans le

testicule en novembre 1897, et mort en avril 1898. L'examen microscopique montre une accumulation de cellules lymphatiques en voie de division active par karyokinèse. Dans cette tumeur, comme dans la précédente, on ne voit plus les levures inoculées ; la culture, d'après l'auteur lui-même, n'a donné aucun résultat.

Les faits pouvant être considérés comme positifs, avec production de vraies tumeurs, se réduisent en somme à 2 sur plus de 60 chiens inoculés, et les tumeurs obtenues sont de type histologique différent.

Pour expliquer les insuccès nombreux, San Felice doit faire intervenir des considérations de race et de prédisposition individuelle : pour expliquer l'absence de cultures provenant des tumeurs expérimentales, il doit supposer un état de la levure devenue incultivable.

Admettons qu'il ne s'agisse pas d'un simple hasard, et que les tumeurs produites sont bien le résultat de l'inoculation des levures. Peut-on en conclure que les cancers sont dus à des levures? Je crois que la conclusion dépasserait de beaucoup les faits.

Wlaeff a étudié aussi le rôle pathogène des levures, et, en les inoculant dans le péritoine d'un rat, a obtenu une fois, au milieu de tumeurs granuleuses, la production d'un adénome kystique développé aux dépens de l'épithélium intestinal inclus dans la tumeur à levure. Les levures sont parfaitement reconnaissables dans le tissu interstitiel ; elles ne se trouvent pas dans les cellules épithéliales. (Nous avons là une confirmation de ce fait que la cellule épithéliale n'est pas le lieu des levures.)

Mieux que les observations de San Felice, ce fait montre que, au voisinage d'une tumeur à levure, il peut y avoir prolifération de la cellule épithéliale par une action à distance. Mais on n'a pas le droit d'en conclure que le parasite des tumeurs cancéreuses est une levure. La coccidie du lapin provoque aussi la formation d'adénomes.

Il y a là seulement des faits très intéressants sur le rôle pathogène des levures ; il faut savoir gré à San Felice de les avoir étudiés avec soin, parce qu'ils nous montrent que pour expliquer le développement anormal d'une cellule épithéliale et la production de tumeurs cancéreuses, les recherches ne doivent

pas être limitées au seul groupe des Sporozoaires. Peut-être faudra-t-il penser aussi à des bactéries, à des champignons, peut-être même à des levures, parasites qui seraient non pas dans le tissu épithélial lui-même, mais dans le stroma conjonctif des tumeurs, là où l'observation microscopique montre si souvent des processus réactionnels intenses.

Chaque type de tumeur devra être étudié individuellement, et on ne saurait parler d'*un microbe du cancer*.

Peut-être y aura-t-il plus tard des tumeurs à Sporozoaires, peut-être des tumeurs à bactéries, peut-être même des tumeurs à levures. Toutes les hypothèses sont permises, mais jusqu'ici aucune ne nous paraît démontrée.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE III

Fig. 1, 2, 3, 4, 5. — Reproduction de quelques figures du travail de Sawtchenko, montrant différentes formes d'inclusions cellulaires considérées par lui comme parasites.

Fig. 6. — Coupe de testicule du cobaye montrant différents stades de la formation du spermatozoïde.

a. Spermatocyte avec un idiosome contenant 2 grains centrosomiques.

b' multiplication des grains centrosomiques.

c, *b*, *d'* développement et concentration de la substance chromatique dans l'intérieur d'une vacuole de l'archoplasma.

e. l'idiosome arrive au contact du noyau et le coiffe, prolongements archoplasmiques aboutissant à la formation de l'anneau; début de l'énucléation cellulaire.

f. *g*. stades plus avancés de la formation du spermatozoïde.

Fig. 7. — Une cellule de la moelle osseuse chez le lapin, grains centrosomiques multiples, d'après Heidenhain.

Fig. 8. — Une cellule cancéreuse montrant très nettement l'archoplasma coloré en bleu foncé par le carmin d'indigo, dans l'archoplasma des pseudo-parasites qui ne sont que des portions de la sphère.

PLANCHE IV

Fig 1. — Une cellule cancéreuse; coloration par le rouge Magenta suivi de picro-indigo carmin après fixation au Flemming.

Dans le protoplasma, une sphère archoplasmique colorée en bleu foncé, à l'intérieur 4 grains centrosomiques en diplocoques.

Fig. 2. — Une sphère archoplasmique plus développée dans la cellule cancéreuse, et contenant une longue chaînette de centrosomes.

Fig. 3. — Dans une cellule cancéreuse, une sphère avec prolongements radiaires contenant des grains centrosomiques de différentes grosseurs.

Fig. 4. — L'archoplasme s'entoure d'une vacuole dans la cellule cancéreuse, et se présente sous forme de 2 pseudo-amibes intra-cellulaires.

Fig. 5, 6, 7. — Différentes formes de vacuolisation totale de l'archoplasma.

Fig. 8. — Dans une cellule cancéreuse, certains grains centrosomiques sont en voie de développement et individualisés dans des vacuoles plus ou moins grosses. Il reste au centre un petit chapelet de grains non différenciés.

Fig. 9 et 10. — Division de l'archoplasma contenant de très nombreux grains centrosomiques.

PLANCHE V

Fig. 11. — Une cellule cancéreuse contenant un très grand nombre de centrosomes, début de la vacuolisation protoplasmique : il reste des grains en amas non entourés de vacuoles.

Fig. 12. — Forme du pseudo-parasite en œil de pigeon (von Leyden) comparer avec Planche III, fig. 6 *d d'*. Dans la cellule, des grains centrosomiques au nombre de 6 non différenciés.

Fig. 13, 14, 15, 16, 17. — Différentes formes de pseudo-amibes intra-cellulaires par groupes de 2 ou 4; presque toujours on trouve au centre de la cellule, autour des vacuoles, des grains centrosomiques en amas.

Fig. 18, 19, 20, 21. — Formes compliquées, monstrueuses, de développement et de dégénération de l'archoplasma de la cellule cancéreuse.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'ORIGINE DE L'ALEXINE DES SÉRUMS NORMAUX.

PAR LE Dr O. GENGOU (DE LIÉGE).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Malgré la concordance de la théorie leucocytaire de M. Metchnikoff avec tous les faits de l'immunité naturelle, le rôle des globules blancs dans la défense de l'organisme ne fut pas, sans objection, admis par tous les bactériologistes. Aussi le pouvoir bactéricide que von Fodor, Nuttall, Flügge, etc., trouvèrent au sérum sanguin des animaux normaux, servit-il de base aux adversaires de la théorie cellulaire, à laquelle ils opposèrent la théorie humorale, dont Büchner se fit un des plus ardents défenseurs. L'alexine de Büchner, qui se trouve dans les sérums normaux, était pour eux la clef de tous les phénomènes d'immunité naturelle.

Toutefois, d'autres auteurs allemands émirent des doutes sur l'existence de cette alexine et Baumgarten, par exemple, s'appuyant sur les recherches de Jetter [1], de Szeleky et Szana [2], de Walz [3], prétendit que la diminution du nombre des bactéries ensemencées dans un sérum dépendait, non pas d'une substance particulière, comme le soutient Büchner, mais du passage brusque d'un milieu dans un autre, ce qui entraînerait la mort des microbes faibles, les plus résistants seuls parvenant à s'y multiplier. Nous ne voudrions pas nous étendre trop longuement sur cette hypothèse; cependant il y a certains faits qui plaident assurément contre cette manière de voir. C'est ainsi que Denys et Kaisin [4] observèrent que, contrairement à ce que dit Jetter, le nombre

1. Jetter, *Arch. auf d. Geb. d. path. Anat.* Bd. I, 1892.
2. Szeleky et Szana, *Cent. f. Bakter.* Bd. XII, 1892.
3. Walz, *Uber die Sogenannte bactericide Eigenschaft des Blutserums*, 1899.
4. Denys et Kaisin, *La Cellule*, 1893.

de germes tués par le sérum est proportionnel à la quantité et à la qualité de ce sérum, et non à la quantité de microbes ensemencés; en outre que des bactéries, provenant de cultures jeunes, par conséquent résistantes, ou de cultures faites dans du sang du même animal, par conséquent accoutumées à ce milieu, ne supportent pas mieux que des cultures vieilles, en somme affaiblies, ou provenant d'autres milieux, c'est-à-dire non accoutumées, le passage dans du sérum frais. De même la fixation de l'alexine sur les microbes ou les globules rouges, si bien démontrée aujourd'hui (Bordet [1]), est totalement en opposition avec l'hypothèse dont il s'agit. D'autres faits encore, tels que la découverte de l'antialexine (Bordet [2]), y trouveraient aussi difficilement une explication quelconque. Finkh [3] est revenu cependant à la charge, en montrant qu'il suffit d'ajouter une trace de sels à du sérum bactéricide, pour lui enlever tout son pouvoir; ce fait ne prouve évidemment rien, car on peut tout aussi bien admettre que ces sels détruisent l'alexine ou empêchent son action.

L'hypothèse de Baumgarten ne rendit donc nullement compte des faits observés par Büchner, etc., et la théorie alexique n'en resta pas moins très en vogue en Allemagne. Cependant l'auteur de la théorie cellulaire maintint ses propositions, signalant d'autre part les faits nombreux où le pouvoir bactéricide des sérums normaux est en contradiction avec l'immunité. Peu à peu, on se mit à rechercher l'origine de ce pouvoir bactéricide du sérum, et les promoteurs initiaux eux-mêmes de la théorie humorale reconnurent, en partie du moins, le bien-fondé de la théorie cellulaire. C'est ainsi que Werigo [4] démontra, en injectant dans le torrent circulatoire des cultures microbiennes, que les oscillations que subit alors le pouvoir bactéricide du sérum, et qui avaient été déjà signalées par Nissen [5], étaient complètement en rapport avec des variations identiques du nombre des globules blancs dans le sang. Bastin [6], Everard, Demoor et Massart [7], Havet [8] firent la même constatation; Bordet obtint

1. Bordet, *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1900.
2. Bordet, *Loc. cit.*
3. Finkh, *Centr. f. Bakter.*, 1900.
4. Werigo, Ces *Annales*, 1891.
5. Nissen, *Zeitschr. f. Hyg.*, 1888.
6. Bastin, *La Cellule*, 1892.
7. Everard, Demoor et Massart, Ces *Annales*, 1893.
8. Havet, *La Cellule*, 1894.

le même résultat en injectant simplement du carmin dans le courant sanguin des animaux.

Les leucocytes paraissaient donc avoir un rôle prépondérant dans le pouvoir bactéricide du sérum, et la démonstration en fut faite en effet. Denys et Havet [1] notamment, ayant obtenu des exsudats riches en globules blancs, y constatèrent un pouvoir bactéricide supérieur à celui des sérums sanguins correspondants; seulement il n'est pas tenu, dans les expériences telles que ces auteurs les ont établies, suffisamment compte d'un facteur très important, à savoir la phagocytose, attendu qu'ils se servent d'exsudats où les leucocytes sont vivants. Peu après, Büchner [2] se servait de cette méthode, et, après avoir tué les leucocytes par le froid suivi d'une brusque élévation de température, obtenait un liquide extrêmement bactéricide et dans lequel la substance germicide, l'alexine, disparaissait, comme dans les sérums sanguins, à 55°. D'autres encore reprirent le sujet; Bail, Schattenfroh, Lowit, Jacob obtinrent des extraits par des méthodes diverses (voir à ce propos la revue de M. Besredka [3]), et qui prêtent fort à la critique, puisque dans tous il y a adjonction de substances étrangères aux leucocytes (Lowit, Bail, Jacob) ou action d'une température élevée (Schattenfroh).

L'origine leucocytaire de l'alexine du sérum était de la sorte admise par la grande majorité des auteurs, quand M. Pfeiffer, se basant sur la transformation granuleuse du vibrion cholérique, en dehors de toute action apparente des leucocytes, fit revivre la théorie humorale de Flügge. Ce phénomène servit naturellement de critérium dans un grand nombre de recherches ultérieures sur l'origine du pouvoir bactéricide du sérum. Si la théorie humorale était vraie, le phénomène de Pfeiffer devait s'observer dans les liquides formés dans l'organisme, sans intervention quelconque des globules blancs; aussi M. Metchnikoff [4], ayant provoqué, par le ralentissement de la circulation, des œdèmes passifs, privés de leucocytes, et y ayant injecté des vibrions cholériques, y chercha-t-il la transformation granuleuse; jamais il ne put l'y observer, ce qui démontrait

1. Denys et Havet, *Idem*, 1894.
2. Buchner, *Cent. f. Bakter.* 1894.
3. Besredka, Ces *Annales*, 1898.
4. Metchnikoff, *Idem*, juin, 1895.

l'absence de toute alexine dans ce milieu. De même, M. Bordet[1], ayant retiré de semblables œdèmes obtenus chez le lapin, même vacciné contre le choléra, démontra que, *in vitro* comme *in vivo*, le phénomène de Pfeiffer faisait totalement défaut, et que le milieu pullulait de microbes après quelques heures.

La contre-partie restait à faire, et elle le fut. M. Metchnikoff ayant injecté des vibrions sous la peau de cobayes vaccinés contre le choléra, constata l'absence complète du phénomène de Pfeiffer à l'endroit de l'injection, tant que les leucocytes n'y furent pas arrivés, et, quand il se produisit, ce fut toujours à l'intérieur de ces derniers[2]. Ce fait fut observé également par M. Salimbeni[3], chez les animaux hypervaccinés contre le bacille diphtérique, le streptocoque de Marmorek et le vibrion cholérique. Injectés sous la peau de ces animaux, ces microbes ne meurent qu'à l'intérieur des leucocytes, qui eux seuls aussi transiorment en boule le vibrion du choléra.

En résumé, le phénomène de Pfeiffer, l'arme nouvelle de la théorie humorale, servit de plus en plus à la démonstration de la théorie cellulaire. Seulement, M. Salimbeni insista sur ce point que toujours la mort des bactéries se produisait uniquement dans les leucocytes polynucléaires et jamais dans les leucocytes mononucléaires. Ce fait est absolument conforme à ce qu'avait observé M. Metchnikoff et qu'il avait bien voulu me communiquer oralement : c'est que si les leucocytes mononucléaires peuvent, comme les globules blancs à noyaux multiples, phagocyter les microbes vivants, ils ne peuvent pas comme eux détruire aussi rapidement ces derniers, et ils deviennent en dehors de l'organisme de véritables cultures bactériennes.

C'est là un fait qui mérite grande attention, et qui n'a pas suffisamment été pris en considération par les auteurs qui avaient auparavant recherché le pouvoir bactéricide *in vitro* des exsudats à globules blancs. Du reste, cette distinction ne fut pas faite davantage ultérieurement par ceux qui se sont encore occupés de l'origine leucocytaire de l'alexine des sérums. C'est ainsi que dernièrement, alors que tant de preuves avaient été fournies

1. Bordet, *Idem*, juin 1895.
2. Si, dans le péritoine, on voit, comme M. Metchnikoff l'a observé lui-même, le vibrion cholérique se transformer en boule, ce n'est que quand il y a eu phagolyse, et que un certain nombre de leucocytes, morts ou très altérés, ont laissé leur alexine sortir de leur protoplasme.
3. Salimbeni, Ces *Annales*, 1897.

en faveur de la théorie cellulaire, Moxter [1] s'affirma défenseur de la théorie humorale. Recherchant la production du phénomène de Pfeiffer dans les exsudats leucocytaires, *sans déterminer l'espèce à laquelle il s'adressait*, il ne l'y trouva que faible et inférieur à celui que donne le sérum sanguin. Du reste, le travail de Moxter présente d'autres imperfections qui peuvent avoir eu quelque importance dans les résultats de cet auteur : c'est ainsi que, dans certains cas, il emploie, sans aucune tentative d'extraction de l'alexine, les exsudats tels quels, sans s'occuper de leur richesse comparative en leucocytes, alors qu'il est bien connu que chez le chien, l'exsudat, plus abondant, est aussi plus riche en cellules que chez le lapin, et aussi qu'on observe de grandes variations entre les divers sujets d'une même espèce animale; d'autres fois, il cherche un pouvoir bactéricide intense — et sans succès, — dans l'exsudat privé de ses cellules par la centrifugation, admettant *a priori* que si le leucocyte est l'origine de l'alexine, il la sécrète, lui vivant, ce qui, croyons-nous, n'a pas encore été démontré; enfin, dans une dernière série d'expériences, Moxter constate que les leucocytes, traités par la méthode de Büchner, contiennent de l'alexine : seulement il néglige cette fois d'indiquer le pouvoir bactéricide du sérum des mêmes animaux, ce qui rend impossible la comparaison nécessaire dans ces expériences.

Peu après, von Dungern [2], concluant à l'absence d'alexine hémolytique dans les exsudats à globules blancs, omettait également de rechercher l'espèce leucocytaire dont il se servait. Enfin, récemment, Bail [3], reprenant la méthode primitive de l'ensemencement périodique en plaques qu'avait employées Büchner, arrivait aisément à démontrer l'origine leucocytaire de l'alexine chez le chien, tandis qu'il lui était impossible de faire la même démonstration chez le lapin; lui non plus, du reste, ne se soucie pas de savoir s'il s'agit de leucocytes à un ou à plusieurs noyaux.

Il nous a paru intéressant de reprendre cette question en y introduisant ce facteur, si peu observé par la plupart des auteurs précédents, c'est-à-dire l'importance que peut avoir la nature

1. Moxter, *Deutsche med. Woch.*, 1899.
2. V. Dungern, *Münch. medic. Wochenschr.*, 1899.
3. Bail, *Central. f. Backter.*, 1900.

de l'espèce leucocytaire en jeu ; nous prions M. Metchnikoff de recevoir ici l'expression de notre vive reconnaissance pour l'intérêt avec lequel il a suivi ce travail, et pour les multiples et précieux conseils qu'il a bien voulu nous donner.

Dans la première partie, nous nous sommes uniquement occupé de rechercher si réellement les leucocytes contiennent une substance analogue à l'alexine du sérum normal ; dans la seconde, nous chercherons à savoir s'il faut admettre, comme le pense M. Metchnikoff, que l'alexine leucocytaire ne diffuse du globule blanc que quand ce dernier est mort ou très avarié, ou si, comme le croit M. Büchner, l'alexine constitue une véritable sécrétion vitale du leucocyte. C'est pourquoi nous n'avons pas parlé, dans l'historique qui précède, des recherches qui ont eu pour but d'éclaircir ce dernier point, nous réservant de le faire dans la suite.

PREMIÈRE PARTIE

Recherche de l'alexine dans les exsudats leucocytaires.

Nous nous sommes servi, pour obtenir des leucocytes en abondance, chez le chien comme chez le lapin, de la gluten-caséine, employée d'abord par Buchner [1]. En injectant dans les cavités pleurales de ces animaux, 4 c. c. d'une solution alcaline de gluten-caséine, on obtient un exsudat, où les leucocytes abondent, et pouvant varier chez le lapin, de 2 à 4 c. c. et chez le chien de 10 à 13 c. c. pour chaque plèvre. Mais l'espèce leucocytaire varie, suivant que l'on retire l'exsudat 24 heures après l'injection intra-pleurale, ou seulement après 2 ou 3 jours ; extrêmement riche, dans le premier cas, en leucocytes polynucléaires, l'exsudat, dans le second, contient une forte majorité de mononucléaires.

Cette substance nous a permis, chez le chien comme chez le lapin, d'obtenir de grandes quantités de leucocytes presque

1. Voici la façon suivant laquelle il nous a paru préférable de préparer le liquide à injecter dans les plèvres du lapin. La gluten-caséine du commerce est broyée finement, puis ajoutée à la dose de 1 pour 10 à une solution à 1/2 0/0 de potasse, chauffée à 100°. Après une demi-heure, le mélange est porté pendant 2 à 3 heures au bain-marie à 55°. On obtient ainsi un liquide jaunâtre, extrêmement louche, qui contient une grande quantité de la gluten-caséine renfermée dans le produit commercial. Le liquide est stérilisé deux jours de suite pendant un quart d'heure à 100°, puis sert à l'injection.

exclusivement polynucléaires ; c'est elle aussi qui nous a servi chez le chien, pour collecter des leucocytes à un seul noyau ; chez le lapin, nous basant sur la démonstration qu'a faite M. Metchnikoff [1] de la phagocytose des globules rouges de lapin par les macrophages mononucléés du cobaye, nous avons injecté, dans la cavité pleurale, des globules rouges lavés de cobaye ; après 2 jours, on retire de la plèvre un liquide extrêmement visqueux contenant, à côté d'une certaine quantité de fibrine, une forte quantité de leucocytes, qui sont, pour ainsi dire, tous de grandes cellules à un seul noyau.

L'exsudat aseptique, une fois retiré de la plèvre, est centrifugé ; les leucocytes, réduits de la sorte à leur véritable volume, sont lavés deux fois à l'eau physiologique et, après dernière centrifugation, additionnés de leur volume de bouillon. Cette émulsion est congelée, d'après la méthode de Buchner, en la plongeant dans de la glace additionnée de sel marin. Après deux ou trois heures, l'exsudat est rapidement transporté de ce mélange à une température de 37° où, ainsi que Buchner l'a montré, la mise en liberté de l'alexine leucocytaire est grandement facilitée. L'exsudat est ainsi laissé 24 heures à l'étuve, puis soumis à l'expérimentation, comparativement avec un volume identique de sérum, de bouillon, etc.

Pour constater le pouvoir bactéricide des extraits leucocytaires ainsi obtenus, nous avons utilisé la méthode des plaques, faites à des intervalles de plus en plus éloignés de l'ensemencement des milieux en expérience. Nous avons employé, pour le chien et le lapin, le vibrion cholérique, le *bacillus typhosus*, le *bacterium coli* et la bactéridie charbonneuse.

I

EXSUDATS RETIRÉS DES CAVITÉS PLEURALES 24 HEURES APRÈS L'INJECTION DE GLUTEN-CASÉINE

A. *Lapin.* — 1. Exsudat de la plèvre droite : 83 0/0 de leucocytes polynucléaires.

Exsudat de la plèvre gauche : 95 0/0 de leucocytes polynucléaires.

1. Metchnikoff, *Ann. Pasteur*, 1899.

Microbe ensemencé : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocytaire. (Pl. g.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)	Extrait leucocytaire. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules (Pl. dr.)
I. (Immédiatem. après l'ensemencement.)	3,250	4,023	10,135	3,800	7,813	4,025	3,031
II. (3 heures après.)	3,029	23	8,432	3,242	802	1,347	510
III. (24 heures après.)	∝	41	∝	8	2	0	19
IV. (48 heures après.)	∝	0	∝	8	0	0	0

2. Exsudat de la plèvre droite : presque uniquement des leucocytes polynucléés ; il en est de même de la plèvre gauche. Microbe ensemencé : *Bacillus typhosus.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)	Extrait leucocyt. (Pl g.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)
I.	1,162	4,549	6,398	7,268	1,376	13,840	15,600
II.	2,080	1,015	2,776	3,770	1,777	5,466	11,200
III.	∝	0	∝	0	∝	0	∝
IV.	∝	0	∝	0	∝	0	∝

3. Exsudat de chaque cavité pleurale : presque exclusivement des leucocytes polynucléaires. Microbe ensemencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. dr.)	Extrait leucocyt. (Pl. g.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. g.)
I.	630	544	537	432	578	629	490
II.	631	348	438	3	31	11	9
III.	∝	5	∝	1	2	3	0
IV.	∝	3	∝	0	2	0	0

4. Exsudat de la plèvre droite : 85 0/0 de leucocytes polynucléaires.

Exsudat de la plèvre gauche : 89 0/0 de leucocytes polynucléaires.

Microbe ensemencé : *Vibrion cholérique.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules. (Pl. dr.)	Extrait leucocyt. (Pl. dr.)	Exsudat privé de cellules (Pl. dr.)
I.	1,521	1,830	1,271	1,642	1,402	1,910	1,763
II.	1,603	0	1,108	0	1,442	0	1,508
III.	∞	0	∞	0	∞	0	∞
IV.	∞	0	∞	0	∞	0	∞

5. Exsudat renfermant 79 0/0 de leucocytes polynucléaires. Microbe ensemencé : Vibrion cholérique.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	12,008	11,964	6,480	10,144	8,576
II.	12,422	0	7,020	800	1,872
III.	∞	0	∞	55	5,712
IV.	∞	0	∞	0	∞

6. Exsudat contenant 98 0/0 de leucocytes polynucléaires. Microbe ensemencé : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	3,657	14,160	1,520	19,160	6,118
II.	10,160	10	5,895	8	54
III.	∞	0	∞	0	2
IV.	∞	0	∞	0	0

Il résulte de ces tableaux que, chez le lapin, l'extrait leucocytaire, obtenu comme nous l'avons indiqué plus haut, est manifestement bactéricide, lorsqu'il s'agit de globules blancs à noyaux multiples.

B. *Chien.* — Toujours, chez le chien, la gluten-caséine nous a donné, après 24 heures, des exsudats formés, pour ainsi dire, exclusivement de leucocytes polynucléaires.

1. Microbe expérimenté : Vibrion cholérique.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	8,652	5,760	5,460	14,600	3,312
II.	3,730	25	1,785	520	52
III.	17,280	0	∞	0	0
IV.	∞	0	∞	0	0

2. Microbe expérimenté : *Bacillus typhosus.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de leucocyt.
I.	4,816	6,708	1,376	2,316	4,304
II.	3,212	52	3,300	200	2,410
III.	∞	0	∞	0	0
IV.	∞	0	∞	0	0

3. Microbe expérimenté : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de leucocyt.
I.	2,970	2,860	5,376	10,260	8,360
II.	4,320	159	1,906	2,394	7,760
III.	∞	∞	∞	∞	∞
IV.	∞	∞	∞	∞	∞

4. Microbe ensemencé : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	4,515	5,590	7,740	2,584	2,332
II.	13,103	864	12,672	448	13,130
III.	∝	21,449	∝	∝	∝
IV.	∝	∝	∝	∝	∝

5. Microbe ensemencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	152	125	154	560	159
II.	118	115	145	184	95
III.	26,100	∝	∝	7	∝
IV.	∝	∝	∝	3	∝

En résumé, chaque fois que, chez le chien, le sérum du sang est bactéricide, il en est de même de l'extrait obtenu des leucocytes polynucléaires ; c'est le cas pour le bacillus typhosus et le vibrion cholérique. Au contraire, le sérum du chien s'est montré peu bactéricide pour le coli-bacille et la bactéridie charbonneuse ; mais si, de même, le coli-bacille est assez résistant pour se multiplier malgré la puissance bactéricide de l'extrait leucocytaire, il n'en est plus de même de la bactéridie charbonneuse. Ce fait a été signalé bien des fois déjà, et c'est, de tous les résultats précédents, le seul qui puisse faire supposer que les leucocytes polynucléaires contiennent plus de substance bactéricide que le sérum sanguin, et qui permette de penser qu'ils en soient l'origine.

Mais dans les expériences ainsi établies, il n'est pas tenu suffisamment compte de ce fait que, pour obtenir l'extrait leucocy-

taire, on mélange les globules blancs à un volume égal de bouillon, par conséquent à un milieu extrêmement favorable au développement microbien, et que l'on n'a pas ajouté au sérum. Pour juger avec plus de raison si un volume donné de sérum contient plus ou moins de substance bactéricide qu'un même volume de leucocytes polynucléaires ; il faut mettre ces deux volumes dans des conditions identiques, c'est-à-dire ajouter à un volume de sérum un volume égal de bouillon, comme nous l'avions fait pour obtenir l'extrait leucocytaire. C'est pourquoi nous avons comparé, dans l'expérience suivante, ce qui se passe quand on ensemence, d'une part du sérum normal, et de l'autre un mélange à parties égales de sérum et de bouillon.

LAPIN

CHARBON			CHOLÉRA			COLI			TYPHUS		
Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.	Pl	Sérum	Sér.-bouill.	Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.	Pl.	Sérum.	Sér.-bouill.
I.	2,030	2,317	I.	1,948	1,690	I.	2,979	2,596	I.	2,417	2,630
II.	1,520	2,430	II.	631	1,124	II.	1,624	2,908	II.	419	1,520
III.	0	∞	III.	0	∞	III.	0	∞	III.	0	∞
IV.	0	∞	IV.	0	∞	IV.	0	∞	IV.	0	∞

CHIEN

CHOLÉRA		
Plaques.	Sérum.	Sérum-bouillon.
I.	1,521	1,609
II.	1,282	1,627
III.	319	∞
IV.	0	∞

Cette expérience montre que des microbes peuvent parfaitement se multiplier dans un mélange à parties égales de sérum

normal et de bouillon, alors que nous les avons vus mourir dans un mélange exsudat-bouillon. Un volume donné de leucocytes contient donc plus de substance bactéricide que le même volume de sérum neuf.

Toutefois, il reste à démontrer qu'il s'agit bien, dans les deux cas, d'alexine, c'est-à-dire d'une substance bactéricide détruite à 55°: c'est ce que montre le tableau suivant, où l'on peut voir le pouvoir microbicide des extraits leucocytaires, préparés suivant la méthode indiquée plus haut, disparaître à cette température, de même que celui du sérum, ainsi que Nuttall l'a autrefois établi.

LAPIN

	CHOLÉRA		CHOLÉRA		CHARBON	
Plaques.	Extrait non chauf.	Extrait chauffé.	Extrait non chauf.	Extrait chauffé.	Extrait non chauf.	Extrait chauffé.
I.	10,144	18,800	15,680	5,670	3,208	4,024
II.	800	13,184	8,120	5,540	3,190	3,725
III.	55	∞	2,720	16,800	0	∞
IV.	0	∞	0	∞	0	∞

Il résulte de tout cela que les leucocytes polynucléaires, obtenus aseptiquement dans la cavité pleurale du chien et du lapin, contiennent en plus grande quantité de l'alexine, semblable à celle du sérum, et qu'ils peuvent être considérés comme la source du pouvoir bactéricide du sérum normal.

II

EXSUDATS RETIRÉS 2 OU 3 JOURS APRÈS L'INJECTION INTRAPLEURALE DE GLUTEN-CASÉINE.

A. Chien. — Voyons ce qui se passe si on utilise, au lieu de

leucocytes polynucléaires, des globules blancs à un seul noyau. Pour obtenir chez le chien une certaine quantité de ces derniers, nous avons, ainsi qu'il a été dit plus haut, encore eu recours à l'injection, dans la cavité pleurale, d'une solution alcaline de gluten-caséine à 10 0/0; 3 jours après on trouve 3 à 4 c. c. de pus épais, en partie liquide, en partie fibrineux, où on observe au microscope une grande quantité de leucocytes, dont 75 0/0 environ sont des cellules mononucléées, le reste étant constitué par des globules blancs à noyaux multiples. Ce pus, dans les expériences suivantes, a été également traité par la méthode de Büchner.

1. Microbe ensemencé : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	2,331	6,048	4,439	2,394	4,098
II.	3,022	1,323	4,812	2,845	4,250
III.	∝	150,000 environ.	∝	∝	∝
IV.	∝	∝	∝	∝	∝

2. Microbe ensemencé : Vibrion cholérique.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	3,040	3,128	4,905	3,730	3,944
II.	6,152	[illegible]	6,322	6,362	6,912
III.	∝	0	∝	∝	∝
IV.	∝	0	∝	∝	∝

3. Microbe ensemencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	660	540	849	720	872
II.	422	420	812	960	841
III.	/	/	/	/	/
IV.	/	/	/	/	/

4. Microbe ensemencé : *Bacillus typhosus.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.	Exsudat privé de cellules.
I.	38	67	72	42	59
II.	44	1	41	1	67
III.	∝	0	∝	∝	∝
IV.	∝	0	∝	∝	∝

Ces expériences en somme montrent que, chez le chien, les leucocytes mononucléés fournissent un extrait privé totalement ou tout au moins très pauvre en alexine, alors que nous avons vu l'extrait des leucocytes à noyaux multiples être plus bactéricide, pour 3 espèces bactériennes différentes, que le sérum correspondant.

B. Lapin. — Nous nous sommes ensuite occupé des extraits obtenus par la même méthode chez le lapin, où nous avons réussi à collecter, dans les cavités pleurales, des leucocytes mononucléaires, par l'injection de globules rouges de cobaye, à la dose de 2 c. c. par plèvre.

1. Microbe ensemencé : Vibrion cholérique.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	3040	3,108	570	3,840
II.	3,208	32	576	5,760
III.	∞	2	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

2. Microbe ensemencé : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	1,090	942	720	550
II.	748	0	189	228
III.	∞	0	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

3. Microbe ensemencé : *Bacterium coli.*

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	982	1,020	719	908
II.	1,164	1	756	810
III.	∞	91	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

4. Microbe ensemencé : Bactéridie charbonneuse.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Serum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	132	324	372	220
II.	126	2	312	1.022
III.	3.744	0	3.078	∞
IV.	∞	2	∞	∞

5. Microbe ensemencé : *Bacillus typhosus*.

NUMÉRO DES PLAQUES	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé.	Extrait leucocyt.
I.	1.636	704	1,098	1,815
II.	1.352	145	858	1.820
III.	∞	1	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞

En conséquence, chaque fois, chez le lapin comme chez le chien, l'extrait obtenu par la congélation d'un exsudat riche en leucocytes mononucléaires s'est montré pauvre en alexine.

Ces résultats démontrent que *l'alexine, chez le chien et chez le lapin, se trouve en plus grande quantité dans les leucocytes polynucléaires que dans le sérum normal du sang, tandis que les globules blancs à un seul noyau ne doivent en contenir que de faibles proportions. On peut logiquement en déduire que les premiers, les leucocytes à noyaux multiples, sont la source de l'alexine que l'on observe dans le sérum normal.*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CAUSALE DES MODIFICATIONS D'ÉTAT DES COLLOIDES

SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

DE LA

MICELLE ALBUMINOÏDE

PAR LE Dr SWIGEL POSTERNAK

Introduction. — Les colloïdes et les méthodes de détermination du poids moléculaire. Définition des colloïdes. Problème à résoudre.

Chapitre Ier. — Plan et méthode.

Chapitre II. — Sur les albuminoïdes de réserve de *Picea excelsa* en solution acide. Discussion des résultats numériques, ions solubilisateurs, les molécules non dissociées agents précipitants.

Chapitre III. — Preuves tirées des phénomènes d'addition et des effets de dilution. Substitution d'un électrolyte à dissociation très forte par un autre qui dissocie faiblement.

Chapitre IV. — Rôle de la mobilité des ions. Influence de la température. Réaction des albumoses avec l'acide nitrique.

Chapitre V. — Affinité de la micelle albuminoïde, et son rôle dans les phénomènes de précipitation. Mécanisme de la précipitation d'après Virchow, Nasse, Hofmeister. Relation entre l'équivalent endosmotique et les concentrations précipitantes.

Chapitre VI. — Généralisation des règles tirées de l'étude des albuminoïdes de *Picea excelsa*. Sur les albuminoïdes de *Cucurbita Pepo*, *Lupinus albus* et *luteus*, et du blanc d'œuf en solution acide. Sur le quotient $\frac{b}{a}$ et la modification de l'énergie de l'affinité sous l'influence de la température.

Chapitre VII. — L'affinité micellaire est d'ordre adhésif. Grosseur et élasticité micellaire. Agents modifiant la grosseur de la micelle albuminoïde.

Chapitre VIII. — Albuminoïdes en solution alcaline au point de vue de leurs rapports aux sels. Enantiomorphisme tabellaire.

Chapitre IX. — Pouvoir électrisant des ions et des électrolytes. Pouvoir électrisant relatif des ions vis-à-vis d'une micelle conductrice et non conductrice. Le rapport $\frac{b}{a}$ et la modification de la mobilité des ions sous l'influence de la température. Résumé.

Chapitre X. — Mécanisme de la solubilisation des colloïdes. Méthodes de préparation des solutions colloïdes. Rapport entre le pouvoir électrisant et l'énergie solubilisante des électrolytes vis-à-vis des colloïdes à micelles con-

ductrices et non conductrices. Démonstration directe de la variation de la grosseur micellaire. Étude sur le blanc d'œuf. Albuminase.

Chapitre XI. — Mécanisme de la précipitation des colloïdes. Travaux de MM. Wyrouboff et Verneuil sur les oxydes condensés des terres rares. Affinité élective des micelles colloïdes. Précipitation des albuminoïdes par la peptone de Witte, par la gomme arabique et par d'autres polysaccharides.

Chapitre XII. — Sur les phénomènes de coagulation.

Chapitre XIII. — La théorie d'histone de M. Kossel. Remarques sur la chimie cellulaire.

Conclusions.

INTRODUCTION

LES COLLOÏDES ET LES MÉTHODES DE DÉTERMINATION DU POIDS MOLÉCULAIRE. — DÉFINITION DES COLLOÏDES. — PROBLÈME A RÉSOUDRE.

La faculté de changer d'état sous l'influence de causes relativement peu importantes n'appartient pas, comme on sait, en propre aux matières albuminoïdes, mais se retrouve aussi chez la plupart des substances de constitution chimique fort différente que l'on range depuis Graham dans le groupe des *colloïdes*. Cette faculté relève, sans aucun doute, de la même cause que les autres caractères qui donnent aux colloïdes leur physionomie spéciale, notamment la lenteur d'hydrodiffusion, l'impossibilité de passer à travers les membranes, la tendance faible, sinon nulle, à la cristallisation. Aussi nous semble-t-il indiqué, avant de commencer l'exposé de nos recherches sur le mécanisme des modifications d'état des albuminoïdes, de soumettre à une discussion rapide les idées en cours sur l'état colloïde en général. Les questions à étudier dans ce mémoire s'en dégageront avec plus de précision et de netteté.

Déjà Graham s'était demandé s'il ne fallait pas chercher la raison d'être de l'état colloïde dans la *nature composée* des molécules, et la cause des propriétés qui caractérisent les colloïdes dans la *grosseur* des particules en solution. Les travaux ultérieurs des auteurs qui ont appliqué à l'étude de ces substances les méthodes physico-chimiques, telles que la cryoscopie, l'ébullioscopie, la mensuration de la pression osmotique, semblent confirmer cette manière de voir. Cependant, sous l'influence du

malentendu qui s'est glissé petit à petit dans l'appréciation des résultats auxquels amènent ces méthodes, l'hypothèse initiale de Graham s'est métamorphosée en ce sens que c'est dans le *haut poids moléculaire* que l'on a placé l'explication des phénomènes observés dans les solutions des colloïdes.

C'est ainsi que nous lisons dans l'excellent livre de M. Nernst : « La grande lenteur de diffusion (des colloïdes) plaide d'une part en faveur d'une force motrice très faible, c'est-à-dire d'une pression osmotique peu notable, d'autre part en faveur d'une grande résistance au frottement que les molécules rencontrent au cours de leur mouvement dans l'eau; les deux choses peuvent être expliquées par cette supposition que *les colloïdes possèdent un haut poids moléculaire*[1]. »

Certes, cette opinion n'a rien d'excessif tant qu'on l'applique aux substances telles que les albuminoïdes, dont la constitution chimique est très compliquée; mais lorsqu'on l'étend aux corps d'une composition aussi simple que les hydrates et les sulfures de métaux, qui entrent facilement dans des combinaisons chimiques d'un poids moléculaire tout à fait normal, ne semble-t-il pas qu'on dépasse de beaucoup la signification qu'ont donnée au terme molécule les savants qui l'avaient introduit dans la science, signification qui y est consacrée par l'usage?

L'auteur précité se base surtout, en parlant du haut poids moléculaire des colloïdes, sur les résultats des mensurations cryoscopiques et de la pression osmotique des solutions colloïdes, qui ont amené à des nombres assez hauts. En effet, pour prendre quelques exemples, M. Pfeffer a calculé pour la dextrine un poids moléculaire 1,080, pour la conglutine 9,500; MM. Brown et Morris, pour l'inuline 2,200, l'amidon 25,000, pour la malto-dextrine 965; MM. Gladstone et Hibbert, pour l'hydrate de cuivre 6,000; M. Sabaneieff, pour la silice 49,000, le glycogène 1,625; MM. Sabaneieff et Alexandroff pour l'albumine d'œuf 14,000, etc. Mais en admettant même que ces nombres soient exacts et n'aient pas été influencés par les impuretés dont il est si difficile de débarrasser les colloïdes, est-on en droit d'en tirer une conclusion sur le poids moléculaire de ces matières?

Je crois que non. De l'ensemble des faits connus jusqu'ici, il me paraît résulter clairement que les méthodes physico-chimiques

1. M. Nernst, *Theoretische Chemie*, 2 Auflage, Stuttgart, 1898, p. 384.

indiquent moins le poids moléculaire, c'est-à-dire le minimum de substance possédant encore toutes ses propriétés chimiques, que la quantité qui agit comme *unité* sur la modification de la densité de la vapeur, sur l'abaissement de la température de congélation, sur l'élévation de la température d'ébullition, ou l'augmentation de la pression osmotique.

Un minimum, de par sa nature, ne peut être qu'un dans chaque cas particulier. Or, pour un certain nombre de corps, on arrive par la même méthode à des valeurs différentes suivant les conditions dans lesquelles ces corps étaient placés. L'acide acétique en solution éthérée, par exemple, abaisse la température de congélation deux fois moins que le même acide dissous dans l'eau, ce qui amène dans le premier cas à la formule $2C^2H^4O^2$, dans le second à $C^2H^4O^2$. La densité des vapeurs du soufre à la température de 500 degrés environ est de 6,6 à peu près (Dumas, Mitscherlich), ce qui correspond à une valeur de l'unité active égale à S^6 : au-dessus de 800° la densité n'est plus que 2,2 par rapport à l'air. L'unité active est donc dans ces conditions S^2. En solution dans le benzène, le soufre est à l'état de particules S^6, comme l'ont montré, à l'aide de la méthode de Raoult, MM. Paterno et Nasini ; à l'état de particules S^8 en solution dans le sulfure de carbone et le benzène, d'après les recherches plus récentes de MM. Aronstein et Meihuizen ; à l'état de particules S^2 en solution dans S^2Cl^2 suivant MM. Orndorff et Terass[1]. La vapeur du chlorure d'aluminium, d'après les recherches de MM. Friedel et Crafts, possède à la température de 218 à 433 degrés une densité 9,20 ; elle est donc constituée par des particules $2\ AlCl^3$: à une température supérieure à 800 degrés, comme il résulte des travaux de MM. Nilson et Petterson, ces particules subissent une dépolymérisation et les molécules $AlCl^3$ prennent naissance.

Dans ces exemples, dont on pourrait facilement allonger la liste, les vrais minima sont $C^2H^4O^2$, S^2, $AlCl^3$; mais alors les valeurs doubles, triples et quadruples ne peuvent plus figurer comme poids moléculaires, à moins de vouloir admettre que les corps sus-indiqués puissent changer leur constitution chimique sous l'influence des conditions extérieures, ce qui serait en contradiction avec toutes les réactions de ces corps, qui restent les

1. *American Chem. Journal*, t. XVIII, p. 3, 1896.

mêmes, et ce qui serait incompréhensible pour une substance aussi simple que le soufre.

L'étude des propriétés physiques des corps solides a imposé depuis longtemps cette idée qu'ils sont constitués par des agglomérations de molécules assez considérables, toutefois beaucoup au-dessous de la portée du microscope, que nous désignerons avec M. Nægeli sous le nom de *micelles*. De la structure intime de la micelle, qui peut être définie comme le minimum de substance possédant toutes les propriétés *physiques* de cette dernière, nous ne savons que trop peu; mais il n'y a pas de doute possible que des molécules absolument identiques peuvent donner naissance à des micelles avec des propriétés physiques fort différentes : les phénomènes d'allotropie et de polymorphie le prouvent surabondamment.

Lorsqu'on met un corps solide en contact avec un dissolvant quelconque, ou lorsqu'on le soumet à une haute température, il commence à se désagréger progressivement jusqu'à ce qu'un équilibre soit établi entre l'adhésion des molécules entre elles dans la micelle et leur affinité pour les molécules du dissolvant dans le premier cas, ou l'énergie dissociante de la chaleur dans le second.

Pour l'acide acétique dissous dans l'éther, cet équilibre est atteint au moment où la micelle s'est divisée en particules composées de deux molécules dont la soudure semble être plus forte que l'union entre les paires dans l'unité physique. L'eau, qui possède une action dissociante plus énergique que l'éther, a facilement raison aussi de l'adhésion de deux molécules dans les particules doubles.

La désagrégation des micelles se faisant en général très rapidement, nous ne pouvons constater le plus fréquemment que l'état final de la dissociation. Il y a pourtant des cas où il nous est donné de la suivre pas à pas à partir d'un moment donné.

A la température d'ébullition du soufre, qui est à 440°, la dissociation des micelles arrive vite à la formation des particules composées de six atomes de ce métalloïde : à partir de 700° et jusqu'à 1080° la densité de la vapeur diminue *graduellement*, ce qui correspond à la dissociation progressive des particules S^6 en des particules plus petites. Le cas de la dioxyacétone décrit tout

récemment par M. Bertrand, présente un autre exemple de cette dissociation sous les yeux, pour ainsi dire, de l'observateur. Comme il donne en même temps une illustration quasi directe du rapport entre les propriétés physiques d'un corps et la structure intime de ses micelles, nous le conterons en détail.

Une solution aqueuse de dioxyacétone, évaporée à la température ordinaire dans le vide, cristallise en petits prismes plus ou moins nets et brillants. Les cristaux ainsi obtenus sont sensiblement insolubles à la température ordinaire dans l'alcool absolu, l'éther et l'acétone. La même solution aqueuse, évaporée à la température d'ébullition, ou le sirop obtenu par fusion des cristaux, n'a aucune tendance à la cristallisation et se dissout facilement dans ces liquides. Or, l'étude comparée de la dioxyacétone cristallisée et amorphe ou surfondue, par la méthode de Raoult, a montré que la première modification, lorsqu'on la dissout dans l'eau froide, est à l'état de particules $2C^3H^6O^3$, la seconde à l'état de particules deux fois plus petites, et qu'en chauffant graduellement la première solution on assiste à la désagrégation progressive des particules doubles.

Il serait assurément étrange de conclure de ces faits que les cristaux du sucre dont il s'agit posséderaient un poids moléculaire 180 égal à $2C^3H^6O^3$, tandis que le sucre amorphe aurait un poids moléculaire deux fois moins grand. Dans les deux cas la formule et le poids moléculaire restent nécessairement les mêmes. Le mode d'agrégation n'est pas non plus représenté par les deux symboles $2C^3H^6O^3$ et $C^3H^6O^3$, puisque les micelles qui, d'après la définition, sont les unités d'agrégation de la matière à l'état solide, doivent être constituées dans les deux cas par des quantités considérables de molécules. La seule déduction logique et conforme aux faits est la suivante : les micelles cristallines de la dioxyacétone possèdent un *détail de construction* qui manque chez les micelles amorphes de ce sucre : notamment la soudure entre les deux molécules de chaque paire est assez forte pour ne pas être détruite par l'eau froide, sinon avec lenteur. Et puis encore, ce n'est que là où les conditions extérieures n'empêchent pas la formation de ces paires, dont a besoin évidemment l'architecture plus complexe de la micelle cristalline, que les cristaux de la dioxyacétone apparaissent avec toutes leurs propriétés physiques (forme cristalline, solubilité, etc.).

Jusqu'ici nous nous sommes occupés des cas où la dissociation de la micelle n'allait pas jusqu'aux molécules. On connaît aussi des faits où la désagrégation dépasse le terme moléculaire. Les méthodes physico-chimiques, appliquées aux solutions des substances minérales ou des sels organiques, ont amené à des résultats très particuliers, difficiles à comprendre si l'on se tient obstinément à croire que ces méthodes indiquent le poids moléculaire. On a obtenu des nombres qui se rapprochent des deux tiers ou de la moitié du poids que demanderaient les formules NaCl, KNO^3, K^2SO^4, etc., les plus simples, cependant, qu'on puisse imaginer. Ce sont les résultats auxquels sont arrivés d'une façon concordante M. de Vries [1], M. Pfeffer [2], par les méthodes osmotiques, M. Raoult [3], M. Landsberger [4] et beaucoup d'autres par l'ébullioscopie et la cryoscopie. Cette particularité s'explique facilement, comme l'a montré M. Arrhénius, si l'on admet que les molécules salines subissent dans l'eau une dissociation, dite électrolytique, et que les particules qui en résultent, les ions, produisent le même effet sur l'élévation de la température d'ébullition qu'une molécule tout entière ou un agrégat des molécules.

On voit donc que ce n'est que quand la dissociation de la micelle va jusqu'aux molécules — coïncidence très fréquente chez les cristalloïdes organiques, d'où la confusion qui règne dans cette question, et assez rare lorsqu'on prend l'ensemble des matières que nous rencontrons dans la nature — que les méthodes physico-chimiques peuvent servir pour la détermination du poids moléculaire. Dans tous les autres cas, elles n'indiquent que la limite de la désagrégation de la matière, le poids des particules qui ont pris naissance sous l'influence dissociante de l'eau, des autres dissolvants ou de la chaleur.

*
* *

La question d'efficacité des méthodes physico-chimiques une fois mise au point, il devient évident que l'on commet une inexactitude lorsqu'en s'appuyant sur les résultats des études

1. *Zeitschrift f. physik. Chimie*, t. III, p. 103, 1889.
2. *Pflanzenphysiologie*, t. I, Leipzig, 1897, p. 128.
3. *Annales de chimie et de physique*, [5] 28 p. 133, 1883; [6] 2 pp. 66, 99, 115, 1884; [6] 4 p. 401, 1885.
4. *Ber. d. d. Chem. Gesellschaft*, t. 31, p. 458, (1898.)

cryoscopiques, on affirme que les colloïdes sont caractérisés par leur poids moléculaire très haut. Il y a là une autre chose, à coup sûr non moins intéressante, et qu'il s'agit maintenant de bien saisir. Les exemples les plus simples sont souvent les meilleurs. Voici donc une solution aqueuse d'un cristalloïde, du chlorure d'aluminium, par exemple, dont le poids moléculaire correspond, comme nous l'avons vu, à la formule $AlCl^3$. Nous y ajoutons de l'ammoniaque, et observons la formation d'un précipité ayant la composition de l'hydrate d'aluminium, et pouvant être dissous dans l'eau à l'aide d'un artifice très simple que Graham nous a enseigné. Comme le corps en solution possède toutes les propriétés des colloïdes, nous assistons, évidemment, à la genèse d'un colloïde aux dépens d'un cristalloïde. Que s'est-il donc passé? L'apparition de l'hydrate sous l'influence de l'ammoniaque suppose une réaction chimique entre ce dernier corps et le chlorure d'aluminium. Le chimiste représentera le processus par l'équation

$$AlCl^3 + 3NH^4OH = 3NH^4Cl + Al(OH)^3$$

qui signifie qu'une molécule de chlorure d'aluminium a donné naissance à trois molécules de chlorure d'ammonium et à *une* molécule d'hydrate d'aluminium.

Or, cette molécule d'hydrate a cessé d'agir, au moment même de sa production, comme unité sur la modification des constantes physiques de l'eau et c'est justement le point de départ de toutes les autres propriétés colloïdes de la solution. On est en présence ici d'un phénomène complètement opposé à ce que nous avons observé dans le cas des cristalloïdes cités plus haut. Là, la micelle au contact de l'eau donnait naissance à une quantité notable d'unités actives, parce que cette micelle subissait une dissociation plus ou moins complète sous l'influence du dissolvant. Ici, les molécules d'hydrate, leur individualité chimique une fois récupérée, perdent leur faculté d'agir sur la température de congélation, la pression osmotique, etc. Il est évident que la seule cause à incriminer est la formation des agrégats moléculaires. Et comme dans le cas des cristalloïdes la dissociation de la micelle a lieu parce que l'affinité des molécules pour l'eau est plus grande qu'entre elles-mêmes, il est permis, nous semble-t-il, de conclure que, dans le cas de l'hydrate

d'aluminium, les molécules possèdent pour leurs semblables une attraction plus énergique que pour l'eau.

Le même raisonnement peut être appliqué aux hydrates des autres métaux, aux sulfures et à tous les colloïdes dont la constitution chimique nous est connue. Ce n'est que par analogie que nous sommes obligés de l'étendre aux colloïdes d'origine vitale, les albuminoïdes, les hydrates de carbone, etc., ce qui est, d'ailleurs, pleinement justifié, vu l'existence des produits de décomposition de ces corps, tels que les albumoses, les peptones et les dextrines, qui possèdent encore toutes les propriétés chimiques et un état d'agglomération beaucoup moins considérable que les substances mères dont ils dérivent.

*
* *

Nous arrivons donc à cette définition générale des colloïdes, courte et précise, qui a au moins le mérite de ne pas donner comme caractères fondamentaux des propriétés plus ou moins secondaires. *Les colloïdes sont des corps dont les unités physiques, les micelles, ne se désagrègent pas dans l'eau.* C'est là leur caractère essentiel qui les fait classer dans un groupe à part, et non l'aspect extérieur qui peut être très régulier, comme dans les cristaux d'hémoglobine, ni le poids moléculaire qui peut être assez petit, comme chez l'hydrate d'aluminium.

Cette définition fait entrer dans le groupe des colloïdes *tous les corps insolubles dans l'eau sans exception*, et depuis qu'on a obtenu des solutions colloïdes des métaux comme le platine, l'or, l'argent, etc., on conviendra de la légitimité de cette généralisation.

Elle fait écarter de ce groupe les solutions saturées et sursaturées des cristalloïdes, qui changent également leur état sous l'influence de causes minimes. C'est plutôt le résultat de l'affaiblissement de l'affinité de l'eau pour les molécules des cristalloïdes que l'augmentation de l'affinité des molécules dans la micelle.

Cette définition indique aussi de la façon la plus nette ce qu'il faut entendre sous le nom de solution colloïde. Ce n'est pas tout simplement une *suspension* de la matière solide dans le dissolvant, comme le veulent certains auteurs, notamment

MM. Vanino et Stœckl[1] : les particules suspendues sont toujours visibles à l'œil nu ou au microscope, et sont, par conséquent, composées par un grand nombre de micelles. Ce n'est pas non plus une *pseudo-solution*. En employant ce terme, on semble définir la vraie solution comme une dissociation complète (allant jusqu'aux molécules) de la matière. Mais alors l'acide acétique serait en pseudosolution dans l'éther, ou l'acide chlorhydrique, dans l'acide formique, puisqu'ils s'y trouvent à l'état de molécules doubles. Et ne faudrait-il pas introduire encore le terme *hyper-solution* pour les électrolytes qui se dissocient dans l'eau, comme on sait, au delà des molécules. Les colloïdes donnent plutôt des *solutions micellaires*, où l'état d'équilibre entre le pouvoir dissociant du dissolvant et l'attraction mutuelle des particules solides est atteint lorsque les micelles sont séparées les unes des autres. C'est dans la nature des colloïdes de ne pas permettre l'existence simultanée des molécules libres ou des fractions micellaires dans de l'eau : *il est difficile de trouver un exemple de dissociation plus ou moins complète d'une micelle colloïde sans intervention d'une réaction chimique*. Même dans ce dernier cas, la dislocation des unités physiques demande souvent une action très énergique et prolongée du réactif chimique. Je ne rappellerai que la difficulté de préparer le chlorure d'aluminium par voie humide en partant de l'hydrate de ce métal[2].

Enfin, des remarques qui précèdent, se dégage la notion de la relativité de la conception de l'état colloïde. En effet, les

1. *Zeitschrift f. physik. Chemie*, t. XXX, p. 98, 1899.

2. Dans l'introduction de son livre, *Mechanisch-physiologische Theorie der Abstammungslehre*, München und Leipzig, 1884, C. v. Nägeli a opposé le premier les solutions micellaires des albuminoïdes et des hydrates de carbone aux solutions moléculaires des cristalloïdes, et a vu, par conséquent, la différence essentielle entre les deux groupes de solides que nous nous efforçons de faire ressortir dans notre étude. Ce botaniste émérite n'a appliqué malheureusement sa conception qu'aux colloïdes d'origine biologique, et a eu peut-être le tort de lui donner une légère nuance vitaliste en parlant des solutions colloïdes comme d'un état « nouvel et organisé », p. 96. C'est à cela qu'il faut probablement attribuer le peu de succès d'une définition qui s'adapte le mieux à la grande majorité des faits observés chez les colloïdes. Il est vrai qu'elle semble préjuger arbitrairement une limite fixe à la désagrégation de ces matières, et se mettre ainsi en contradiction avec les observations de MM. Linder et Picton, qui ont décrit différents degrés de dissolution des colloïdes entre la pseudo-solution et la solution véritable. Or, si ces auteurs ont réellement démontré l'existence de particules colloïdes plus ou moins grandes suivant la composition du milieu, ils n'ont nullement prouvé que le changement de grosseur était dû à une *dislocation* des particules en solution. Nous aurons l'occasion d'y revenir.

matières qui ne se désagrègent pas dans l'eau peuvent quelquefois être dissociées par un autre dissolvant, et inversement, les corps se dissociant dans l'eau peuvent être insolubles dans d'autres liquides. A ce point de vue, il est intéressant de rapporter un fait observé en 1889 par M. Paterno[1]. Le tannin en solution aqueuse provoque un abaissement de la température de congélation correspondant à un poids des particules égal à 2643-3700. En solution dans l'acide acétique, on arrive par la méthode de Raoult à un poids moléculaire répondant à la formule normale $C^{14}H^{10}O^{9}$. Le tannin se comporte donc comme un cristalloïde dans l'acide acétique et comme un colloïde dans l'eau. De l'autre côté, les cristalloïdes solubles dans l'eau, comme la plupart des sels minéraux, par exemple, sont des matières colloïdes par rapport à l'alcool éthylique ou méthylique dans lesquels ils sont insolubles. Il est à prévoir qu'il serait possible d'obtenir des solutions micellaires de ces matières minérales dans les dissolvants organiques précités, qui posséderaient toutes les propriétés des solutions colloïdes.

Et maintenant une question bien naturelle se pose. Tous les albuminoïdes possédant des micelles qui ne se dissocient pas dans l'eau, à quoi est due la différence dans les conditions de solubilité que l'on constate chez les représentants divers de cette classe de colloïdes? Pourquoi, par exemple, les albumoses sont-elles toujours solubles dans l'eau distillée, tandis que l'albumine d'œuf ou la sérumalbumine l'est seulement dans le cas où on ne l'a pas soumise à une haute température? Pourquoi la caséine, les globulines ne s'y dissolvent-elles guère si l'on n'ajoute pas de petites quantités de sel, d'acide ou d'alcali? Pourquoi faut-il employer un acide minéral en solution faible pour dissoudre la vitelline, la caséine et l'histone, et pourquoi le même acide plus concentré les reprécipite-t-il de leurs solutions? et ainsi de suite.

Il doit y avoir une différence dans les propriétés des micelles d'origine diverse, et une variabilité des propriétés sous l'influence des agents auxquels nous soumettons les micelles en question. Mais alors, quelles sont ces propriétés, quels sont les facteurs capables de les modifier et en quoi peuvent consister ces modi-

1. *Zeitschrifft für Physik. Chemie*, t. IV, p. 457.

fications? [1] Le présent mémoire est une contribution à la solution de ce problème.

I

PLAN ET MÉTHODE

Il n'y a guère de changement d'état des albuminoïdes où les substances minérales ne jouent d'une façon quelconque un rôle plus ou moins important. Les acides et les alcalis appartiennent aux dissolvants les plus employés pour les matières protéiques: les sels, suivant leur concentration, dissolvent quelques-uns et précipitent la plupart des albuminoïdes connus. La présence des sels est également nécessaire pour la production des phénomènes de coagulation soit par la chaleur, soit par les diastases spécifiques : il suffit, comme on sait, de priver le sang, le lait, ou les solutions des matières pectiques, de sels de chaux, pour paralyser presque complètement l'action de la plasmase, de la présure ou de la pectase, et on n'a qu'à diluer le blanc d'œuf de quelques volumes d'eau ou le soumettre à la dialyse prolongée pour qu'il perde sa faculté de se solidifier sous l'influence de la haute température. Et même l'insolubilité de l'histone, précipitée de ses solutions acides à l'aide de l'ammoniaque, dans un excès de ce réactif, phénomène auquel M. Kossl et ses élèves ont cru pouvoir attacher toute une série d'hypothèses aussi ingénieuses que répondant peu à la réalité — nous en aurons la preuve à la fin de ce travail — s'est montré en dernière analyse

1. Le lecteur a reconnu, sans doute, sous cette forme inusitée, la vieille question du rapport présumé entre les réactions physiques des albuminoïdes et leur constitution chimique, présomption qui a servi, comme on sait, de base à la classification des albuminoïdes, à la création des groupes d'albumine, de globuline, de vitelline, de caséine, d'histone, etc. Notre manière de poser la question s'en distingue toutefois par quelques points qui méritent d'être signalés brièvement.

En parlant des facteurs capables de modifier les propriétés de la micelle, nous attirons l'attention sur l'influence si négligée jusqu'ici du *milieu* sur les réactions physiques des albuminoïdes, et faisons concourir à la solution du problème toute une série de faits qui sont en contradiction avec les notions classiques, et qu'on a une tendance à écarter systématiquement comme des exceptions et des curiosités. Ensuite, amenés à reconnaître la possibilité des changements purement physiques de la micelle, nous espérons éviter l'écueil sur lequel sont venus échouer nombre d'auteurs, qui ont conclu à des réactions chimiques là où les phénomènes observés ne cadraient pas bien avec les propriétés généralement attribuées aux albuminoïdes. Nous en trouverons de nombreux exemples au cours de ce travail.

comme un cas banal de précipitation saline. M. Schultz [1] a, en effet, montré que si on lave le précipité de la globuline, insoluble dans l'excès d'ammoniaque, sur un filtre, cet albuminoïde entre en solution et peut être reprécipité à l'aide d'un peu de sel. M. Ivar Bang [2], dans un travail récent sur l'histone, a confirmé cette observation également pour l'histone des globules rouges d'oie, isolée par la méthode de M. Kossel, et pour l'histone du thymus.

Il est donc naturel de s'adresser tout d'abord à l'analyse expérimentale de l'action des substances minérales sur la modification d'état des albuminoïdes. La voie à suivre dans ce genre de recherches est toute tracée. Il s'agit de dissoudre un albuminoïde dans des conditions bien définies, de varier ces conditions à tour de rôle, de façon à déterminer l'influence de chacune d'elles, sur l'état de l'albuminoïde à l'étude, et, enfin, de placer dans les mêmes conditions des albuminoïdes d'une autre constitution chimique pour se rendre compte du rôle joué par la structure moléculaire ou micellaire dans les phénomènes de solution, de précipitation et de coagulation.

Le succès de ces opérations et l'importance des résultats numériques obtenus sera, évidemment, subordonné au choix judicieux des albuminoïdes, et à l'exactitude de la méthode de détermination de la composition minérale du milieu dans lequel ces matières seront successivement placées. Ce sont ces deux points que nous allons discuter tout d'abord.

La plupart des auteurs qui ont étudié le rapport des sels aux albuminoïdes se sont adressés de préférence au sérum sanguin et au blanc d'œuf, à cause probablement de leur accessibilité et de leur importance physiologique. Il m'a semblé cependant préférable de laisser de côté ces liquides organiques qui, ayant de nombreuses fonctions à remplir dans l'organisme vivant, doivent déjà *a priori* être considérés comme des milieux éminemment complexes. Il y a là des facteurs, pour la plupart inconnus, qui viendraient inutilement compliquer nos expériences, en y introduisant au surplus toutes les difficultés parmi lesquelles se débat la chimie de ces milieux.

On a pu croire pendant assez longtemps, après les recherches

1. Der Eiweisskörper des Hämoglobins. *Ztsch. f. physiol. Ch.*, T. XXIV, p. 449.
2. Studien über Histon. *Ibid.* T. XXVII, p. 163, 1889.

de M. Hammarsten[1] sur le sérum du sang, que l'existence de deux albuminoïdes différents, de la paraglobuline et de la sérumalbumine, soit un fait des mieux établis : la paraglobuline serait insoluble dans l'eau et les solutions concentrées de sulfate de magnésie, soluble dans les sels alcalins de faible concentration, la sérumalbumine, soluble dans l'eau et non précipitable par le sulfate de magnésie ou par la dialyse. Ces deux corps ont même été érigés en types pour deux classes d'albuminoïdes, dont on n'a pas tardé à retrouver les représentants dans le blanc d'œuf et dans les extraits des cellules et des tissus. Or, déjà M. Burkhardt en 1882 (*Archiv. f. exp. Path. u. Pharm.*, T. XVI, p. 322) et M. Heynsius, en 1884[2], ont remarqué que le précipité obtenu par saturation du sérum sanguin avec du sulfate de magnésie contient un albuminoïde soluble dans l'eau, même après la dialyse prolongée, et M. Marcus[3] tout récemment, en reprenant l'étude de ce phénomène, a non sans raison qualifié d'illogique la nomenclature courante des albuminoïdes. Il faudrait admettre, en effet, l'existence de globulines solubles dans l'eau ou au contraire d'albumines précipitables par le sulfate de magnésie.

D'un autre côté, MM. Corin et Bérard[4], Corin et Ansieux[5] ont montré que si l'on chauffe très lentement le sérum sanguin ou le blanc d'œuf, débarrassés de leurs globulines par saturation avec du sulfate magnésien, le liquide commence à devenir opalescent et les flocons apparaissent. A ce moment précis on peut, par une agitation et un refroidissement énergiques, faire rétrocéder le processus commençant de coagulation, et réobtenir une solution limpide de l'albumine. Mais ce qui est surtout curieux dans cette expérience, c'est que la solution de l'albumine refroidie a acquis après ce traitement la propriété de précipiter par le sulfate de magnésie. Nous voyons donc dans ce cas une transformation directe de l'albumine en globuline.

Mais, nous objectera-t-on, ce n'est que l'effet de la *dénaturation* de l'albumine sous l'influence de la chaleur ; on pourrait,

1. Ueber das Paraglobulin, *Pflüger's Archiv.*, T. XVII, 1878, p. 413 ; T. XVIII, p. 38.
2. Ueber das Verhaltee der Eiweisstoffe zu Salzen von Alkalien u. von alkalischen Erden, *Pflüger's Archiv.*, T. XXXIV, p. 330.
3. Ueber in Wasser losliches Serumglobulin, *Z. f. physiol. Chimie*, T. XXIII, p. 55 (1899).
4. *Bulletin de l'Académie royale de Belgique*, 3e série, T. XV, p. 643 (1888).
5. *Ibid.* T. XXI, p. 355 (1891).

d'ailleurs, obtenir le même résultat en traitant l'albumine avec un acide ou un alcali à chaud et même à froid, ce qui la transmerait en acide ou alcali-albuminate, lesquels albuminoïdes *dénaturés* précipitent aussi sous l'influence du sulfate de magnésie.

Tout en constatant la commodité du terme qui nous permet de mettre à la charge de la nature les difficultés que nous éprouvons pour expliquer certains phénomènes, je pense, cependant, que la *dénaturation* elle-même ne peut pas être admise sans quelques explications préalables.

On sait que la transformation en acidalbumine est d'autant plus facile que l'acide employé est d'une concentration plus forte et que l'acidalbumine est caractérisée entre autres par la non coagulation de ses solutions acides. Prenons donc deux portions égales de blanc d'œuf, dilué d'un volume d'eau et filtré, mélangeons-les avec leur volume d'acide chlorhydrique à 0,3 pour cent et à 3 pour cent — les mélanges restent limpides — et chauffons-les pendant quelque temps au bain-marie bouillant. On pourrait croire que la deuxième portion mettra moins de temps pour se transformer en syntonine que la première, dont la teneur en acide est dix fois moindre, et que s'il y a coagulation, c'est celle-ci qui la présentera. Or c'est juste l'inverse que l'on observe. La portion la plus riche en acide a coagulé comme le blanc d'œuf initial, celle qui était plus pauvre en acide est restée parfaitement claire et a acquis la propriété de précipiter sous l'influence des sels. Ce phénomène ne peut donc être attribué à la dénaturation. Comment alors coordonner tous ces faits contradictoires?

Il est curieux de noter, entre parenthèses, que quel que soit le traitement auquel on soumet les albumines et les globulines d'origine diverse, on retrouve toujours aux corps altérés des propriétés physiques très analogues, qui les rapprochent singulièrement de la caséine. Les alcalialbuminates, les syntonines classiques, le corps précipité par M. Starke[1] des solutions opalescentes du blanc d'œuf, dialysé à fond et chauffé jusqu'à 70° avec quelques gouttes d'acide dilué, le corps qui est en solution dans de l'acide chlorhydrique à 0,3 0/0 dans notre expérience d'il y a un instant, l'albumine pure de Denis, ainsi que la

1. Sitzungsber. d. Ges. f. Morphologie und Physiologie in München. 1897, Heft 1.

vitelline après un contact prolongé avec de l'eau, tous ces corps sont insolubles dans l'eau distillée, dans les acides concentrés et les sels, solubles dans les acides faibles et les alcalis. En présence de ces faits on est tenté de se demander, en renversant la filiation des phénomènes, s'il ne faut pas voir dans les propriétés spécifiées plus haut la *vraie nature* de la plupart des albuminoïdes, et si les différences qui ont amené les auteurs à la création des groupes albumines, globulines, vitellines, etc., ne sont pas dues à *la dénaturation de matières protéiques aux propriétés physiques très analogues, sous l'influence du milieu dans lequel elles se trouvent normalement.* On verra plus loin que cette interprétation a toutes les chances d'être exacte.

Ces quelques remarques, qui nous seront très utiles au cours de la discussion ultérieure, expliquent suffisamment notre abstention envers le sérum sanguin et le blanc d'œuf : elles n'indiquent pas, cependant, pourquoi notre choix s'était porté sur *les albuminoïdes de réserve des graines végétales.*

Plus on étudie les matières protéiques extraites des graines de semence, plus difficile devient leur classement dans la série des albuminoïdes connus. Ce fait a été constaté d'une façon presque unanime par les auteurs des traités de chimie biologique. Suivant les méthodes employées pour leur extraction et leur étude, on a classé les albuminoïdes de réserve d'origine végétale parmi les caséines (Ritthausen[1]), parmi les vitellines (Weil[2], Hoppe-Seyler), parmi les vitellines et albumoses (Vines[3], Martin[4],) parmi les vitellines spéciales ressemblant par quelques-unes de leurs propriétés aux albumoses (Palladine[5]). Les auteurs américains, avec M. Osborne[6] en tête, ont su en isoler des globulines, des albumines, des albumoses et des peptones. Enfin, M. Hammarsten, en appliquant à cette question des idées nouvelles et en se basant sur les résultats de la digestion pepsique des albuminoïdes de réserve, les a classés parmi les pseudo-nucléoprotéides.

1. *Die Eiweisskörper der Getreidearten, etc.*, Bonn, 1872.
2. *Zeitsch. f. physiol. Ch.*, T. I, p. 72.
3. *Proceedings of the Royal Soc. of London*, T. XXX, p. 387, 1880.
4. *Ibid*, T. XLII, 1889.
5. *Zeitschrift f. Biologie*, T. XIII, N. F. p. 191, 1895.
6. *J. of. Amer. Chem. Soc.*, T. XV, XIX, XX et suivants.
7. *Wiman.* Studien über Legumin. Referat von Hammarsten, *Maly's Jahresberichte*, 1897, T. XXVII, p. 21.

Or, malgré ces dénominations diverses, les albuminoïdes isolés d'une graine par différentes méthodes sont et restent toujours les mêmes, et la faculté très prononcée qu'ils manifestent de prendre des aspects variables sous l'influence des conditions extérieures les fait particulièrement aptes aux études que nous nous proposions d'entreprendre.

Un autre avantage présenté par les albuminoïdes d'origine végétale est en rapport avec ce fait que les différentes graines contiennent des matières protéiques de réserve se distinguant par leur constitution chimique. En traitant donc ces graines par la même méthode, on peut obtenir une série de corps albuminoïdes d'une analogie physiologique incontestable — ils appartiennent tous aux grains d'aleurone — et qui sont assez différents par leur composition chimique pour qu'on soit en mesure de les étudier comparativement au point de vue des propriétés physiques de leurs micelles.

J'ai eu l'occasion, dans un travail antérieur[1], d'insister sur l'influence probable des matières ternaires de réserve sur la solubilité des albuminoïdes de la graine dans l'eau distillée. Il y a été indiqué entre autres que quelques graines huileuses, débarrassées complètement de leurs matières grasses, n'abandonnent à l'eau que des quantités minimes d'albuminoïdes; l'exemple des graines du sapin rouge (*Picea excelsa*) y fut cité. Ces graines ne se comportent pas autrement envers les solutions des sels alcalins à 10 0/0[2] qui servent habituellement pour l'extraction des vitellines, et ne permettent l'isolement de leurs albuminoïdes qu'avec les acides d'une concentration faible et les alcalis. Il me semblait dès lors indiqué de commencer mes recherches justement par l'étude des albuminoïdes du sapin rouge. En choisissant un corps possédant *dès son origine* les caractères d'une matière protéique dénaturée, j'espérais me mettre d'avance à l'abri des objections de toute sorte, tirées de la classification routinière des albuminoïdes et de la théorie de la dénaturation. La base de la discussion une fois

1. Sur le premier produit d'organisation de l'acide phosphorique dans les plantes à chlorophylle, *Revue générale de botanique*, t. XII, p. 5, 1900.

2. *M. Rongger* (*Ueber die Bestandtheile der Samen v. Picea excelsa. Landw. Versuchst*, 1898, p. 89) n'a pu extraire que 4 grammes à peu près de 250 grammes de graines pulvérisées et débarrassées de la plus grande partie de leurs matières grasses. Le rendement devient tout à fait insignifiant si l'on a soin d'éloigner complètement ces matières ternaires.

trouvée, j'ai étendu mes recherches à des albuminoïdes d'autre provenance[1].

J'arrive maintenant à la *méthode de détermination de la composition minérale du milieu*. Celle qui a servi pour mes recherches était fort simple. 2 c. c. d'une solution des albuminoïdes de réserve à 1 0/0, dans de l'acide chlorhydrique ou de la soude d'une concentration donnée, sont versés dans un tube à essai. On y fait arriver goutte par goutte, en agitant, une solution d'acide ou de sel d'une concentration connue, à l'aide d'une burette bien graduée, de façon à pouvoir connaître exactement le volume de la solution saline ajouté et, par conséquent, aussi la quantité d'acide ou de sel. Les burettes sont assez étroites, et graduées de manière à permettre la lecture de 1/100e c. c. On ajoute du sel jusqu'au moment où les flocons d'albuminoïdes cessent de disparaître après l'agitation, et on note alors le volume de solution saline ajouté.

Dans la plupart des cas, ce moment est très facile à reconnaître, car jusqu'à la dernière goutte qui provoquera l'apparition persistante des flocons, la solution reste parfaitement limpide, et la formation des flocons sous l'influence de la dernière goutte saline est très abondante. Dans d'autres cas plus rares, et surtout lorsqu'il s'agit de sels organiques ou de solutions alcalines, le liquide devient opalescent déjà au commencement de l'expérience. Cependant, avec un peu d'exercice et à condition de travailler dans une chambre bien éclairée, on arrive sans trop de peine à bien distinguer le moment d'apparition du précipité insoluble.

Le volume de solution du sel qu'on est obligé d'ajouter à 2 c. c. de solution de l'albuminoïde une fois connu, il est facile de calculer la concentration du sel en pour cent dans l'éprouvette au moment de l'apparition persistante des flocons, ensuite la concentration dite moléculaire, la concentration normale du sel étant prise comme unité.

Il est important de faire remarquer que les chiffres obtenus n'indiquent point la concentration du sel dans laquelle l'albumi-

1. Tous ces albuminoïdes ont été préparés par la méthode dite de Ritthausen : extractions des graines pulvérisées par la soude à 0, 2 0/0 et précipitation par l'acide acétique.

noïde en question est complètement insoluble, les flocons apparus ne représentant qu'une partie très grande, il est vrai, mais non la totalité de l'albuminoïde dissous dans l'acide ou dans la soude. Les expériences instituées à cet égard, et que je communiquerai plus loin dans un tableau spécial, montrent que la concentration du sel augmente avec la dilution de l'albunoïde, quoique plus lentement que cette dernière. C'est ainsi, pour prendre un exemple concret, qu'une solution des albumiminoïdes de réserve du sapin rouge à 1 0/0 dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 donne des flocons abondants, lorsque la concentration moléculaire du chlorure d'ammonium ajouté est de 0,385; la concentration reste la même avec une solution des albuminoïdes à 0,5 0/0: elle monte à 0,419 pour une solution des albuminoïdes à 0,25 0/0, à 0,493 pour une solution à 0,125 0/0 et, enfin, à 0,537 pour une solution des albuminoïdes à 0,0625 0/0. Le même rapport se retrouve pour d'autres sels. On comprend donc aisément que le chlorure d'ammonium ajouté jusqu'à la concentration moléculaire 0,385, lequel nombre sera seul marqué dans nos séries, précipite tout au plus les trois quarts de l'albuminoïde en solution.

Les nombres précédents nous montrent aussi qu'il est nécessaire d'éviter des variations notables dans la concentration des matières protéiques, si l'on veut avoir des résultats comparables. C'est pourquoi, dans toutes nos expériences, sauf quelques cas exceptionnels, on n'ajoutait pas plus de 2 c. c. de réactif. La concentration ne variait, par conséquent, que dans les limites extrêmes de 1 à 0,5 0/0 et l'erreur imputable à la méthode, à cause de la nécessité d'ajouter des quantités variables de solution saline dans les expériences parallèles, devenait ainsi tout à fait insignifiante[1].

1. Pour l'étude du rapport des sels et des albuminoïdes, M. Nasse, M. Hofmeister et ses élèves se sont servis d'autres méthodes, conçues en vue de pouvoir travailler avec des concentrations identiques de ces derniers corps. M. Nasse (*Pflüger's Archiv*, t. XLI, 504, 1887) ajoute une goutte d'albuminoïde à 10 c. c. de solutions salines à *concentration croissante*, placées dans des éprouvettes, et distribue par des mouvements doux cette goutte dans la couche supérieure du liquide. La concentration du sel dans l'éprouvette où la goutte provoque pour la première fois un trouble est regardée comme celle qui précipite l'albuminoïde à l'étude.

Cette méthode est franchement mauvaise. Il est difficile de distinguer un trouble d'une opalescence, ce dernier phénomène cependant ne coïncide pas toujours avec la concentration nécessaire à la précipitation, comme nous l'avons vu plus haut.

II

SUR LES ALBUMINOÏDES DE RÉSERVE DE PICEA EXCELSA EN SOLUTION ACIDE. — DISCUSSION DES RÉSULTATS NUMÉRIQUES. — IONS SOLUBILISATEURS, MOLÉCULES NON DISSOCIÉES, AGENTS PRÉCIPITANTS

Les résultats numériques des recherches qui font l'objet de ce travail sont rassemblés dans une série de tableaux que nous allons passer en revue.

Le tableau I résume les expériences faites avec une solution des albuminoïdes du sapin rouge à 1 0/0 dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00.

M. Hofmeister (*Arch. f. exp. Path. u. Pharmak*, t. XXIV, p. 247, 1888) et M. Lewith (*Ibidem*, p. 1) distribuent la solution de l'albuminoïde dans des éprouvettes, à raison de 2 c. c. dans chacune. Ils versent dans ces tubes des *volumes croissants* d'une solution saturée de sel, et remplissent tous les tubes jusqu'à la concurrence de 10 c. c. Si après agitation le précipité formé tout d'abord se dissolvait dans l'eau surajoutée, la concentration du sel dans l'éprouvette examinée était au-dessous de celle qui est nécessaire à la précipitation. Quelques essais permettent facilement de trouver la concentration voulue du sel, et on a l'avantage de la connaître toujours pour la même concentration de l'albuminoïde.

Or, cette méthode assez maniable, lorsque le nombre d'expériences n'est pas très notable, devient peu commode s'il s'agit d'une grande quantité de détermination avec des sels et albuminoïdes différents. Chaque expérience demande une série de tubes, et, pour des essais tels que ceux sur l'influence de la température par exemple, les séries seraient à recommencer plusieurs fois. De plus, la méthode de M. Hofmeister implique une erreur peut-être plus marquée que celle qui est due à la variation de la concentration de l'albuminoïde. La matière protéique en solution vient en contact avec une quantité de sel supérieure à celle nécessaire à sa précipitation, et ceci suffit pour modifier la solubilité de l'albuminoïde dans l'eau. On peut s'en assurer de la façon suivante : On détermine par notre méthode la quantité de sel qu'il faut ajouter à 2 c. c. de solution de l'albuminoïde du sapin rouge à 1 0/0 dans HCl, à 1 0/00, on ajoute encore une fois autant de sel et on laisse reposer pendant quelques minutes. On peut constater alors que 2,5 c. c. d'eau distillée, tout en ramenant la concentration du sel au-dessous du nombre obtenu dans le premier essai, n'arrivent guère à dissoudre le précipité. Pour obtenir cet effet, il faut ajouter encore de l'eau ou agiter pendant très longtemps. Ce phénomène est dû probablement à ce que l'eau a à réagir non seulement contre les facteurs dont dépend la solubilité ou l'insolubilité de la micelle albuminoïde, mais aussi contre l'agglomération des micelles insolubles en flocons.

TABLEAU I

2 C. C.
Picea excelsa. Solution des albuminoïdes de réserve à 1 p. c. dans HCl à 1 p. m.

C.R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C. V.R.	De 8 à 10° C. C %	De 8 à 10° C. C.M. a	Température d'ébullition. V.R.	Température d'ébullition. C %	Température d'ébullition. C.M. b	$\frac{b}{a}$
10 0/0	HCl	36,458	0,33	1,415	**0,388**	0,61	2,335	**0,640**	1,65
20 0/0	NH_4Cl	53,52	0,23	2,06	**0,385**	0,39	3,26	**0,609**	1,58
«	NaCl	58,5	0,21	1,9	**0,325**	0,35	2,98	**0,509**	1,57
«	KCl	74,59	0,33	2,83	**0,380**	0,58	4,5	**0,603**	1,59
«	1/2 $MgCl_2$	47,62	0,16	1,48	**0,311**	0,23	2,06	**0,432**	1,39
«	1/2 $SrCl_2$	79,26	0,34	2,90	**0,366**	0,55	4,31	**0,544**	1,48
«	1/2 $BaCl_2$	104,15	0,55	4,31	**0,414**	0,97	6,53	**0,627**	1,51
10 0/0	NH_4Br	98,03	0,58	2,25	**0,230**	1,68	4,56	**0,465**	2,02
«	NaBr	103,01	0,52	2,06	**0,200**	1,30	3,56	**0,363**	1,81
«	KBr	119,1	0,65	2,45	**0,206**	1,90	4,87	**0,409**	1,99
«	NaI	149,91	0,23	1,03	**0,069**	0,95	3,22	**0,216**	3,13
«	KI	166,00	0,39	1,63	**0,098**	1,80	4,73	**0,285**	2,91
«	HNO_3	63,048	0,19	0,865	**0,137**	0,59	2,28	**0,361**	2,63
«	NH_4NO_3	80,11	0,24	1,07	**0,135**	0,90	3,105	**0,387**	2,87
«	$NaNO_3$	85,09	0,22	0,99	**0,116**	0,76	2,75	**0,323**	2,78
«	KNO_3	101,18	0,32	1,38	**0,136**	1,32	3,97	**0,392**	2,86
«	1/2 H_2SO_4	49,038	0,07	0,339	**0,0714**	∞	∞	∞	∞
«	1/2 $(NH_4)_2SO_4$	66,1	0,05	0,244	**0,0376**	0,14	0,65	**0,097**	2,6
8 0/0	1/2 Na_2SO_4	71,08	0,05	0,195	**0,0274**	0,15	0,56	**0,078**	2,84
10 0/0	1/2 K_2SO_4	87,17	0,07	0,339	**0,0402**	0,19	0,865	**0,099**	2,46

Le lecteur voudra bien ignorer pour quelques instants la partie droite du tableau, qui représente les nombres obtenus à la température d'ébullition, et ne s'occuper que de la partie gauche faite à la température de 8 à 10° C. De toutes les colonnes de chiffres qu'on y trouve, la dernière, imprimée en caractères gros et marquée d'un *a* à la tête, est la plus importante. Elle représente les concentrations moléculaires C. M. des sels dans lesquels le précipité albuminoïde devient persistant après l'agitation. La première colonne indique la concentration du réactif employé C. R.; la deuxième et la troisième, le réactif et son poids moléculaire P. M.; la quatrième, le volume du réactif, ajouté en centimètres cubes V. R.; enfin, la cinquième, la concentration du sel nécessaire à la précipitation calculée en pour cent, C 0/0.

Nous y avons donc tous les éléments pour la vérification des calculs et pour l'orientation facile.

Il est à peine nécessaire d'ajouter que chaque nombre présente la moyenne d'au moins deux déterminations bien concordantes. L'expérience fut répétée et donna le même résultat avec une préparation des albuminoïdes de sapin rouge d'une autre provenance.

En examinant la partie gauche du tableau, on est tout d'abord frappé par la quantité faible de substance minérale qu'il faut ajouter pour obtenir un précipité d'albuminoïdes de réserve de Picea excelsa en solution acide. Il n'en faut que 1,415 0/0 de l'acide chlorhydrique, que 2 0/0 du chlorure d'ammonium et ainsi de suite. Pour les iodures, la quantité de sel est de 1 0/0 à peu près et pour les sulfates de 1/3 0/0.

Ensuite, on est surpris de voir la concentration moléculaire pour les sels du même acide varier dans des limites très étroites. Pour l'acide chlorhydrique, la concentration est de 0,388, pour le chlorure d'ammonium 0,385, pour le chlorure de potassium 0,380: pour le chlorure de sodium, la concentration moléculaire baisse notablement, elle n'est que 0,325. J'avoue qu'au commencement de mes recherches je fus désagréablement impressionné par cette exception à la règle qui semblait découler des nombres qui précèdent. L'expérience fut répétée plusieurs fois, la burette qui a servi pour le sel marin et dont la graduation m'était devenue suspecte fut changée : on a préparé une autre

solution de chlorure de sodium : le résultat restait le même.

Le même phénomène s'observe pour les sels de sodium des autres acides et pour tous les albuminoïdes examinés par moi, comme on le verra aux tableaux suivants. C'est donc bien une propriété des sels de sodium de précipiter en moindre concentration les albuminoïdes de leurs solutions acides. Ce fait, comme les oscillations positives et négatives pour les sels de magnésium, de strontium et de baryum, est un de ceux qui demandent une explication.

Il s'agit maintenant de rechercher, par la discussion raisonnée des nombres précités, à quoi peut bien être due la précipitation des albuminoïdes par les acides et les sels ? Examinons le cas le plus simple. Une solution des albuminoïdes de réserve du sapin rouge dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 est précipitée lorsque la concentration de l'acide monte à 1,415 0/00. Il n'y a que trois matières en présence dans cette expérience : l'albuminoïde, l'eau et l'acide, et par un mécanisme qu'il importe d'élucider, l'acide qui favorisait au commencement de l'expérience la solubilisation de l'albuminoïde dans l'eau n'agit plus lorsque sa concentration est devenue plus grande. Le simple bon sens nous recommande de chercher la cause de ce phénomène dans les modifications des propriétés de l'acide sous l'influence de l'augmentation de la concentration. Parmi ces propriétés, la *conductibilité électrique* est assurément la plus curieuse.

On sait que l'acide chlorhydrique à l'état sec, ainsi que l'eau chimiquement pure, est rebelle au passage du courant électrique. Ces deux substances mélangées ensemble deviennent conductrices de l'électricité. On attribue l'apparition de cette nouvelle propriété physique à la *dissociation électrolytique* dont nous avons parlé déjà plus haut, à la faculté que possèdent les molécules inertes de certaines substances (sels, bases et acides minéraux et organiques, électrolytes en un mot) de se dissocier dans l'eau en particules actives, porteurs d'une charge électrostatique positive ou négative, et qui sont désignées sous le nom *d'ions*.

La conductibilité électrique étant provoquée par la dissociation électrolytique, on conçoit facilement qu'elle augmentera avec la concentration de l'électrolyte, avec la quantité des molécules dissociées ou, autrement dit, avec le nombre des ions

libres. Or, de nombreuses mensurations ont montré que si la conductibilité électrique augmente réellement avec la concentration de l'électrolyte, elle n'est pas directement proportionnelle à cette dernière et croît beaucoup plus lentement. De là deux conséquences qu'il est important de bien retenir :

1° Quelle que soit la concentration d'une solution d'un électrolyte, excepté les solutions extrêmement diluées, il y a toujours une quantité plus ou moins grande des molécules non dissociées ;

2° Le nombre des molécules non dissociées par rapport aux molécules ionisées est d'autant plus grand que la solution est moins concentrée.

Nous ne pouvons pas entrer ici dans les détails de la théorie de la dissociation électrolytique développée pour la première fois par M. Arrhenius[1]. Nous dirons seulement qu'on peut facilement calculer, en partant de la conductibilité électrique, le degré de dissociation et d'après l'équation où λ représente la conductibilité

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda\infty}$$

moléculaire, $\lambda\infty$ la conductibilité électrique dans des solutions extrêmement diluées (pouvant, par conséquent, être regardées comme complètement dissociées) qui est égale à la somme des mobilités $u+v$ des deux ions, d'après la loi de Kohlrausch sur la pérégrination indépendante des ions.

A l'aide de cette équation, et en consultant les tableaux de conductibilité des électrolytes[2], on peut s'assurer que le degré de la dissociation électrolytique d'une solution d'acide chlorhydrique à 1 0/00 dont la concentration moléculaire est de 0,0273, est à peu près égal à 0,95, c'est-à-dire que, sur 100 molécules de HCl en solution, 95 sont dissociées. Le rapport des molécules dissociées et non dissociées est donc de 19. Le degré de dissociation de HCl à 1,415 0/0 (0,388 concentration moléculaire) est égal à 0,86, et le rapport des molécules dissociées et non dissociées n'est, par conséquent, que de 6.

Il y a donc une grande différence dans le rapport des molé-

1. Ueber die Dissociation der in Wasser gelösten Stoffe, *Z. f. physikal. Chemie*, t. I, p. 631, 1887.

2. Nous nous sommes servis des tableaux composés par MM. *Kohlrausch et Holborn : Das Leitvermögen der Electrolyte*, Leipzig, 1898.

cules dissociées et non dissociées dans les deux cas, et la première idée qui vient en présence de cette constatation est que ce sont les ions qui possèdent la faculté de solubiliser la micelle albuminoïde, et ce sont les molécules non dissociées qui empêchent cette solubilisation. Il y aurait comme une lutte, au fond de notre éprouvette, entre les ions et les molécules non dissociées pour la possession de la micelle albuminoïde. Dans le cas de la victoire des ions libres, les micelles resteraient en solution ; dans le cas contraire, les micelles vont s'agglomérer et devenir insolubles. Mais, pour chaque électrolyte, la force relative des molécules et des ions serait plus ou moins constante.

Eh bien, cette explication, qui nous permet de poursuivre le phénomène si obscur de l'action des substances minérales sur la solubilité et l'insolubilité d'un albuminoïde dans le monde même invisible des molécules, a encore un avantage dont ne peuvent se vanter beaucoup d'hypothèses proposées dans l'histoire des matières protéiques. Elle est susceptible d'être démontrée par l'expérience. Les conséquences que nous tirerons de notre hypothèse non seulement seront vérifiées par l'observation directe, mais nous amèneront à la découverte de faits nouveaux qui serviront au développement de l'hypothèse elle-même.

III

PREUVES TIRÉES DES PHÉNOMÈNES D'ADDITION ET DES EFFETS DE DILUTION DES ÉLECTROLYTES. SUBSTITUTION D'UN ÉLECTROLYTE A DISSOCIATION TRÈS FORTE PAR UN AUTRE QUI DISSOCIE FAIBLEMENT

Voyons d'abord si l'action des différents réactifs, notés dans le tableau I, va s'additionner. Ajoutons à 2 c. c. de la même solution des albuminoïdes, qui nous a servi pour la composition du tableau I, 0,11 c. c. de HCl, au lieu de 0,33 nécessaires pour obtenir un précipité, et cherchons à déterminer la quantité de chlorure d'ammonium ou de sodium qu'il faut encore ajouter pour produire la précipitation.

A première vue, on devrait s'attendre à ce que le volume de la solution à ajouter pour produire l'effet désiré fût égal à deux tiers de celui qui est marqué au tableau. Ainsi, ce volume étant

de 0,21 c. c. pour le chlorure de sodium et de 0,23 pour le chlorure d'ammonium, on devrait s'attendre à trouver le volume ajouté égal à 0,14 c. c. pour le premier de ces sels, et à 0,15 pour le second. Il n'en est rien en réalité. Pour obtenir la précipitation dans les conditions de cette expérience, il nous faut un volume beaucoup plus considérable, exactement 0,17 c. c. pour le NaCl et 0,18 pour le NH^4Cl.

Si l'on prend, au lieu de 0,11 c. c. d'acide chlorhydrique, deux fois autant, le volume des sels à ajouter sera de 0,12 c. c. au lieu de 0,07 et 0,08 calculés.

Le même phénomène s'observe également avec d'autres sels, et quelques-unes de mes expériences à cet égard sont consignées dans le tableau II.

TABLEAU II

HCl.	0,11	c. c.		NaCl.	0,17	au lieu de	0,14 c. c.
«	0,22	«		«	0,12	«	0,07 «
«	0,11	«		NH_4Cl	0,18	«	0,15 «
«	0,22	«		«	0,12	«	0,08 «
NaCl.	0,07	«		KCl.	0,27	«	0,22 «
«	0,14	«		«	0,22	«	0,11 «
NaBr.	0,18	«		KBr.	0,52	«	0,44 «
«	0,36	«		«	0,35	«	0,22 «
HNO_3	0,10	«		KNO_3	0,22	«	0,16 «
«	0,15	«		«	0,16	«	0,08 «

Il ne serait pas juste de chercher la cause de cette prétendue irrégularité dans les défectuosités de la méthode elle-même. Le tableau III, qui présente les résultats obtenus avec quelques acétates, va nous indiquer à peu près la précision et l'exactitude que l'on est en droit d'attendre de notre méthode si simple. On voit dans ce tableau que la concentration moléculaire des acétates est encore moindre que celle des sulfates, et qu'elle approche très sensiblement de 4 la concentration moléculaire de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 qui est égale à 0,0273.

TABLEAU III

2 C. C. *Picea excelsa.* Solution à 1 p. c. dans HCl à 1 0/00.				
RÉACTIF à 2 0/0.	P.M.	A LA TEMPÉRATURE VOULUE		
		V.R.	C 0/0	C.M.
$NaC_2H_3O_2$	82	0,25	0,222	0,0271
$KC_2H_3O_2$	98	0,29	0,253	0,0260
1/2 $Ca(C_2H_3O_2)_2$	79	0,24	0,216	0,0273
1/2 $Ba(C_2H_3O_2)_2$	127,5	0,44	0,361	0,0283

Rien d'étonnant dans cette coïncidence. HCl, acide plus énergique, remplace l'acide acétique dans les sels ajoutés, et nous n'avons plus qu'une solution des albuminoïdes dans de l'acide acétique de la même concentration moléculaire. Or, l'acide acétique d'une concentration aussi faible dissout, comme on peut s'en assurer par l'expérience, tout au plus un tiers pour cent des albuminoïdes de Picea excelsa. Le précipité obtenu n'est donc pas le résultat d'une précipitation saline de l'ordre étudié par nous, mais bien une modification d'état due au changement du milieu dissolvant.

Les nombres marqués au tableau nous certifient cependant que l'erreur de la méthode ne se manifeste que dans la troisième décimale de la concentration moléculaire, et ne dépasse pas une unité dans un ou dans l'autre sens, du moins dans les conditions de cette expérience. Quant aux phénomènes d'addition dans le cas des acétates, où il ne s'agit, en somme, que d'une réaction purement chimique. on constate que les chiffres du deuxième sel trouvés coïncident presque avec ceux qui sont calculés.

$NaC_2H_3O_2$.	0,05 c. c.		$KC_2H_3O_2$	0,23	au lieu de	0,232 c. c.
«	0,15 «		«	0,12	«	0,116 «
«	0,10 «		$Ba(C_2H_3O_2)_2$	0,28	«	0,264 «
«	0,20 «		«	0,09	«	0,088 «

Ce n'est donc pas à la méthode que sont dus les écarts observés précédemment. Ils trouvent leur explication et même une impérieuse raison d'être dans notre hypothèse et les consi-

dérations qui en découlent. Lorsque deux électrolytes sont dissous ensemble dans une quantité donnée d'eau, chacun d'eux se dissocie comme s'il était seul en solution[1]. Or, en ajoutant un tiers de l'acide chlorhydrique nécessaire pour la précipitation, nous n'avons pas introduit un tiers des molécules non dissociées, mais beaucoup moins, car plus faible est la solution d'un électrolyte, plus grand devient le rapport entre les molécules dissociées et non dissociés. Les deux tiers du sel surajouté ne contiennent pas non plus les deux tiers des molécules inertes qui seules, d'après notre hypothèse, sont capables de lutter contre l'action dissolvante des ions libres. Force nous est d'augmenter la quantité du sel surajouté pour accroître en même temps le nombre des molécules non dissociées. L'équilibre n'aurait pu être atteint qu'à cette condition[2].

Nous avons vu plus haut que la quantité de sel qu'il faut ajouter à une solution des albuminoïdes dans de l'acide chlorhydrique dépend en partie aussi de la concentration de la matière

TABLEAU IV *a*

2 C. C. *Picea excelsa*. Solution des albuminoïdes de réserve.								
	à 1/2 % dans HCl 1 ‰		à 1/4 % dans HCl 1 ‰		à 1/8 % dans HCl 1 ‰		à 1/16 % dans HCl 1 ‰	
RÉACTIF 20 %	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R	C.M.
HCl	0,33	**0,388**	0,35	**0,408**	0,38	**0,436**	0,45	**0,507**
NH_4Cl	0,23	**0,385**	0,25	**0,416**	0,32	**0,514**	0,34	**0,543**
KCl	0,33	**0,380**	0,37	**0,419**	0,45	**0,493**	0,50	**0,537**
$MgCl_2$	0,16	**0,311**	0,17	**0,331**	0,20	**0,383**	0,24	**0,451**

1. Ceci n'est vrai que d'une façon approximative. L'existence d'un ion commun aux deux sels a pour effet d'abaisser un peu la dissociation.

2. A la suite de leurs recherches sur la précipitation du sulfure d'arsenic MM. Linder et Picton arrivent à la conclusion que « *when salts of the same group are added successively to produce coagulation, the effect is additive* (comme dans le cas des acétates dans nos expériences), *but with salts of differents groups this is no the case.* » *J. of Chem. Soc.* V. 67 p. 67, 1895.

Je n'ai pu confirmer la première partie de cette proposition pour aucun des albuminoïdes étudiés par moi. Les matières protéiques de réserve des semences de courge, de lupin blanc et jaune, le blanc d'œuf se comportaient vis-à-vis des sels alcalins exactement comme les albuminoïdes du sapin rouge.

protéique, et nous avons cité les nombres pour le chlorure d'ammonium. Le tableau IV *a* résume les expériences faites avec l'acide chlorhydrique et d'autres sels.

Au lieu de diluer la solution des albuminoïdes de Picea excelsa avec HCl à 1 0/00, diluons-la avec de l'eau distillée, de façon à avoir des solutions des albuminoïdes à 1/2 0/00, à 1/4 0/0 dans HCl à 1/4 0/00, et ainsi de suite. Il s'agit de savoir maintenant s'il nous faut, pour précipiter ces solutions, ajouter respectivement plus de sel que dans le cas précédent, ou moins. Evidemment moins, et voici pourquoi. Si la concentration de l'acide chlorhydrique qui nous sert pour la dissolution des albuminoïdes est de 1 0/00, en ajoutant du sel nous luttons, d'une part, contre les molécules ionisées de l'acide, d'autre part, contre les ions du sel introduit, puisqu'il nous est matériellement impossible de dissoudre un sel sans avoir provoqué en même temps sa dissociation électrolytique. En diluant l'acide avec 1, 3, 7 volumes d'eau nous augmentons relativement le nombre des molécules ionisées ; en revanche, la quantité absolue des ions est diminuée. Il nous faut donc, pour atteindre l'équilibre, moins de molécules salines inertes que dans le cas de l'acide chlorhydrique a 1 0/00.

C'est ce qui ressort, en effet, du tableau IV *b*, où nous

TABLEAU IV *b*.

2 C. C. *Picea excelsa.* Solution des albuminoïdes de réserve								
	à 1/2 °/₀ dans HCl 1/2 °/₀₀		à 1/4 °/₀ dans HCl 1/4 °/₀₀		à 1/8 °/₀ dans HCl 1/8 °/₀₀		à 1/16 °/₀ dans HCl 1/16 °/₀₀	
RÉACTIF 20 °/₀	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.
HCl	0,34	0,397	0,36	0,419	0,40	0,458	0,44	0,507
NH_4Cl	0,23	0,385	0,25	0,416	0,26	0,430	0,26	0,430
KCl	0,30	0,350	0,32	0,371	0,35	0,399	0,35	0,399
$MgCl_2$	0,16	0,311	0,16	0,311	0,18	0,347	0,19	0,365

constatons que la concentration du chlorure d'ammonium pour une solution de l'albuminoïde à 1/16 0/0 dans HCl à 1/16 0/00 ne monte que jusqu'à 0,430, au lieu de 0,543 dans le cas précédent, et ainsi de suite.

Dans le cas que nous venons d'examiner, le nombre d'ions dans le liquide qui nous a servi pour la dissolution de l'albuminoïde fut diminué par dilution avec de l'eau. Comme la concentration de l'albuminoïde diminuait en même temps, il y avait un facteur qui, agissant dans un autre sens, affaiblissait l'effet de la diminution de la quantité des ions. Mais nous avons un autre moyen d'abaisser le nombre des molécules ionisées, en prenant comme dissolvant un acide qui dissocie moins énergiquement que l'acide chlorhydrique. C'est le cas des acides organiques en général et de l'acide acétique en particulier.

Une solution à 1,6 0/00 de ce dernier acide, équimoléculaire avec celle de HCl à 1 0/00, présente un degré de dissociation égal à 0.025, c'est-à-dire que, sur quarante molécules en solution une seule est décomposée en ions; différence, par conséquent, énorme avec l'acide chlorhydrique, où, sur 100 molécules, 95 étaient ionisées.

On peut donc prévoir que, pour précipiter l'albuminoïde en solution dans l'acide acétique à 1,6 0/00, il nous faudra moins de sel que dans le cas étudié au tableau I. Il est impossible malheureusement, pour l'exactitude des résultats de comparaison, d'obtenir avec ce dissolvant une solution de l'albuminoïde de Picea excelsa à 1 0/0, la quantité maximale qu'on en peut dissoudre étant voisine de 1/3 0/0, comme nous l'avons indiqué plus haut. La différence est d'ailleurs de peu d'importance et devrait plutôt augmenter la quantité de sel. Le résultat de l'expérience résumée dans le tableau V devient encore plus démonstratif.

On voit que les concentrations moléculaires de tous les sels mis à l'épreuve sont notablement diminuées par comparaison avec celles du tableau I. Pour le chlorure d'ammonium, elle est de 0,178 au lieu de 0.385; pour le bromure, 0,0836 au lieu de 0.230; pour le nitrate d'ammonium, 0,054 au lieu de 0,135, et ainsi de suite.

IV

ROLE DE LA MOBILITÉ DES IONS DANS LES PHÉNOMÈNES DE LA MODIFICATION D'ÉTAT DES ALBUMINOIDES. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — RÉACTION DES ALBUMOSES AVEC L'ACIDE NITRIQUE

Voilà donc une série de faits qui concordent parfaitement

TABLEAU V

2 C. C.

Picea excelsa. Solution des alb. de réserve à 1 3 0/0 dans $C_2H_4O_2$ à 1,6 0/00.

C.R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C. V.R.	De 8 à 10° C. C %	De 8 à 10° C. C.M. a	Température d'ébullition. V.R.	Température d'ébullition. C %	Température d'ébullition. C.M. b	$\frac{b}{a}$
20 0 0	NH_4Cl	53,52	0,10	0,952	0,178	0,22	1,98	0.370	2,08
	NaCl	58,5	0,09	0,86	0.147	0,18	1,64	0.280	1,90
	KCl	74,59	0,14	1,30	0.174	0,27	2,38	0.319	1,83
10 0 0	NH_4Br	98,03	0,18	0,82	0,0836	0,53	2,09	0.213	2,54
	NaBr	103,01	0,16	0,74	0,0718	0,44	1,80	0.175	2,3
	KBr	119, 1	0,20	0,91	0,0764	0,58	2,25	0.189	2,5
	NaI	149,91	0,08	0,385	0,0256	0,29	1,26	0.084	3,3
	HNO_3	6 08	0,20	0,91	0,144	0,80	2,85	0.452	3,1
	NH_4NO_3	80.11	0,09	0,43	0,054	0,30	1,30	0.162	3,0
	KNO_3	101,18	0,12	0,54	0,063	0,40	1,66	0.195	3,1
	1/2 $(NH)_2SO_4$	49,038	0,02	0,10	0,015	0,02	0,100	0.015 ?	1

bien avec l'hypothèse telle que nous l'avons formulée plus haut. Sous cette forme, elle est, cependant, loin d'expliquer tous les phénomènes en rapport avec les modifications d'état des albuminoïdes.

D'après notre hypothèse, ce sont les ions qui agissent comme dissolvants pour les albuminoïdes de réserve de Picea excelsa. Les sels en solutions étendues étant presque aussi fortement dissociés que les acides, on pourrait espérer de dissoudre ces albuminoïdes à l'aide des solutions faibles de sels. Pour certaines globulines comme celle du sérum sanguin, du blanc d'œuf, pour le fibrinogène, ceci est parfaitement exact; mais en est-il de même pour les albuminoïdes des graines de sapin rouge, qui sont insolubles, comme nous l'avons déjà vu, dans des solutions de sels alcalins à 10 0/0? Quelques essais faits pour élucider cette question m'ont montré qu'il est impossible de dissoudre une quantité sensible de ces albuminoïdes à l'aide de solutions faibles de sels. Comment expliquer ce fait qui semble en contradition avec notre hypothèse?

Il est évident qu'il doit y avoir une différence entre les ions de l'acide chlorhydrique et des alcalis, qui dissolvent très facilement les matières protéiques du sapin rouge, et les ions des sels neutres. La chimie physique en connaît une, en effet. C'est la *conductibilité équivalente* ou la *mobilité* des ions qui représente la valeur réciproque de l'obstacle que les ions opposent au courant galvanique.

Voici cette valeur pour quelques ions positifs et négatifs, à la température de 18°, d'après Kohlrausch et Holborn.

H	NH_4	Na	K	$^1/_2$ Mg	$^1/_2$ Sr	$^1/_2$ Ba
318	64,2	44,4	65,2	49,0	54,0	57,3
OH	Cl	Br	I	NO_3	$^1/_2$ SO_4	$C_2H_3O_2$
174	65,9	66,9	66,7	60,8	69,7	33,7

On remarque de suite que la mobilité de l'hydrogène et de l'hydroxyle est représentée par des nombres de beaucoup supérieurs à ceux des autres ions.

Et comme nous voyons que les électrolytes, possédant dans leurs molécules des ions à grande mobilité, sont justement ceux dont les solutions étendues solubilisent les albuminoïdes de Picea excelsa, il nous semble indiqué d'introduire dans notre hypothèse encore cette notion que *les ions agissent d'autant plus*

fortement sur la solubilisation des matières protéiques que leur mobilité est plus grande.

Eh bien, cette notion va nous donner directement l'explication du fait qui nous a intrigué si longtemps, notamment la cause de l'action précipitante plus forte des sels de soude. La mobilité du sodium est de 44,4, celle du potassium 65,2 et celle de l'ammonium 64,2. La mobilité du sodium est donc plus faible, et l'action des ions de sodium, ajoutée à celle des ions de l'acide chlorhydrique, présentera une somme moindre de résistance à vaincre que l'addition des ions $NH^{\cdot}$ ou K, d'où la moindre quantité des molécules non dissociées nécessaire à la précipitation, et partant une concentration moléculaire du sel plus faible.

Nous avons vu également, dans le tableau 1, que la concentration moléculaire des chlorures de Mg, Sr et Ba va en augmentant (0,311; 0,366; 0,414). Or, la mobilité de ces éléments est respectivement 49 : 54 ; 57,3. Mais la concentration moléculaire de ces sels à base alcalino-terreuse n'est pas directement comparable à celle des sels à base alcaline, parce que la dissociation dans le cas des électrolytes ternaires obéit à des lois plus compliquées et peu élucidées jusqu'ici. C'est pourquoi nous n'avons pas étendu nos expériences sur ces électrolytes dans les séries qui suivent.

***

La notion sur l'influence de la mobilité des ions sur la solubilisation des albuminoïdes m'a inspiré une expérience que je n'aurais certes jamais entreprise, tellement elle va à l'encontre de ce qu'on enseigne généralement sur les phénomènes de coagulation des matières protéiques sous l'influence de la température.

Je me suis dit que si la précipitation des albuminoïdes de leurs solutions n'est qu'un état d'équilibre entre trois facteurs physico-chimiques, le nombre des ions, leur mobilité, et la quantité des molécules non dissociées, on devrait pouvoir facilement détruire cet équilibre en augmentant ou diminuant l'intensité d'un de ces facteurs.

En ajoutant de l'eau dans l'éprouvette où le précipité venait d'être provoqué à l'aide d'un sel ou d'un acide quelconque, on augmente le degré de dissociation électrolytique, on diminue,

par conséquent, le nombre des molécules non dissociées et on fait accroître celui des ions. Le précipité se redissout facilement.

Mais on peut aussi modifier la mobilité des ions, et ceci sans toucher au degré de dissociation. On sait, en effet, que la mobilité des ions augmente avec la température, tandis que la ionisation des électrolytes n'est presque pas modifiée par cet agent physique. Si l'on soumettait alors l'éprouvette où la précipitation venait d'être obtenue à l'échauffement, la mobilité des ions en présence et partant leur action solubilisante étant augmentée, on devrait assister à la dissolution du précipité. L'équilibre, qui existait avant que la température n'eût été élevée, aurait été rompu en faveur des solubilisateurs.

Ceci arrive, en effet, et, ce qui est encore plus intéressant, le *précipité dissous réapparaît lorsque la température est ramenée au degré initial*. Nous sommes aussi loin de la notion sur la coagulabilité des albuminoïdes en milieu acide et en présence des sels que de la théorie de la dénaturation. Si le précipité est entré en solution quand on a chauffé, ce n'est pas évidemment parce qu'il s'est transformé en acidalbumine sous l'influence de l'acide chlorhydrique et de la température — il n'aurait pas réapparu après refroidissement — mais bien parce que nous avons élevé momentanément l'action d'un agent solubilisant.

Pour neutraliser cet effet, on n'a qu'à ajouter encore du sel pour augmenter le nombre des molécules non dissociées qui, grâce à leur fonction antagoniste, arrivent à contrebalancer l'influence de la température.

Aussi voyons-nous qu'à chaque température correspond une concentration moléculaire définie des sels à ajouter pour la précipitation, et cette concentration s'élève avec la température. Nous ne communiquons dans ce travail que les nombres obtenus à la température d'ébullition. On les trouvera dans les parties droites des tableaux I et V.

On y remarque les mêmes régularités que pour les nombres déterminés à la température de 8 à 10° C. Les sels de chaque acide ont une concentration très voisine, les sels de sodium présentent toujours le minimum, et, ce qui est surtout remarquable, le rapport b/a entre les concentrations moléculaires à la température d'ébullition et à celle de 8 à 10° est aussi très voisin pour les sels du même acide. Ce rapport est partout supérieur

à l'unité : il est, en moyenne, égal à 1,60 pour les chlorures, à 1,94 pour les bromures, à 3,02 pour les nitrates et à 2.63 pour les sulfates, dans le cas des albuminoïdes de *Picea excelsa* en solution dans l'acide chlorhydrique. Il est indéfiniment grand pour l'acide sulfurique, ce qui veut dire qu'il est impossible de précipiter ces albuminoïdes à l'aide de l'acide sulfurique à 100 0 à la température d'ébullition, en n'ajoutant pas plus de 2 c. c. de ce réactif, suivant la règle que nous nous sommes imposée pour ces recherches. Il est, d'ailleurs, impossible de réaliser la précipitation à cette température, même avec de l'acide sulfurique plus concentré.

Il est évident que si l'on avait ajouté, pour précipiter à froid les albuminoïdes, un grand excès d'acide ou de sel, de façon à dépasser même la concentration moléculaire nécessaire à la température d'ébullition, l'élévation de la température ne provoquerait pas la dissolution. C'est à cette circonstance qu'il faut attribuer ce fait que la propriété des albuminoïdes que nous venons de décrire a échappé pendant si longtemps à la sagacité des spécialistes.

Et cependant, ce phénomène n'est pas absolument inconnu. On sait, depuis les recherches de M. Kühne sur les produits de digestion pepsique des albuminoïdes, que l'acide nitrique, ajouté avec précaution à une solution des albumoses, donne un précipité qui se dissout à la température d'ébullition et réapparaît après refroidissement.

La constatation n'ayant été qu'empirique, on n'a pas tardé de regarder le phénomène comme une réaction spécifique en quelque sorte pour les protalbumoses.

Lorsque M. Kossel[1] a découvert, en 1884, l'histone, et lui a trouvé entre autres la réaction avec l'acide nitrique, il n'a pas hésité à regarder cette nouvelle matière comme un membre de la grande famille des albumoses, possédant par conséquent une constitution chimique plus simple que les albuminoïdes ordinaires. Il est vrai qu'il a changé d'avis depuis. L'histone est actuellement pour cet auteur plutôt un corps complexe, une combinaison de la protamine avec un albuminoïde quelconque[2].

1. Ueber einen peptonartigen Bestandtheil des Zellkernes, *Zeitsch. f. physiol. Ch.*, T. VIII, p. 511.
2. Ueber die Lymphzellen, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1894, p. 146.

M. Palladine, au cours de son travail sur les albuminoïdes d'origine végétale, a cherché entre autres à vérifier l'affirmation des auteurs anglais sur l'existence des albumoses dans les graines de semence. En appliquant les règles élaborées par l'école de M. Kühne pour l'isolement de ces matières, il n'a obtenu que des résultats négatifs. Comme il a remarqué que les albuminoïdes isolés par lui donnaient la réaction avec l'acide nitrique, il a pensé mettre d'accord tout le monde, en déclarant que les graines ne contiennent que des vitellines ressemblant, par quelques-unes de leurs réactions, aux albumoses.

Or, la réaction avec l'acide nitrique, comme nous l'avons vu précédemment, n'est qu'un cas spécial d'un phénomène plus général qu'on peut provoquer avec tous les acides minéraux et même les sels. Elle n'a rien à voir ni avec la constitution chimique plus ou moins complexe des albuminoïdes, ni avec leur origine végétale, puisque nous la retrouverons plus loin aussi chez l'albumine d'œuf. Elle n'est due, répétons-le encore une fois, qu'à l'augmentation temporaire de la mobilité des ions sous l'influence de la température.

Les développements de cette conception feront l'objet d'un prochain mémoire.

SUR LA « TRISTEZA »

PAR J. LIGNIÈRES

Chef des travaux à l'Ecole vétérinaire d'Alfort, chargé de mission par l'Institut Pasteur.

Sous le nom de « Tristeza » on connaît, dans la République Argentine et dans l'Uruguay, une maladie des bovidés absolument identique à la fièvre du Texas, si bien étudiée aux États-Unis par Smith et Kilborne.

Pendant la durée de ma mission en Argentine, l'étude de cette affection a été l'un de mes principaux objectifs; je me suis astreint à en refaire complètement l'étude.

Mon travail, publié à Buenos-Aires par les soins de l'association des Hacendados[1], peut se résumer ainsi qu'il suit : on va voir que si je confirme un grand nombre de faits connus, j'en apporte un certain nombre de nouveaux d'une réelle importance.

Des conclusions de Smith et Kilborne, je confirme, entre autres points :

1° La spécificité du *Piroplasma bigeminum;*

2° L'altération des globules rouges comme cause principale des lésions et des symptômes observés;

3° L'inoculabilité de la maladie aux bovidés par injections sous-cutanées ou intra-veineuses du sang ou de la pulpe des viscères ou des tissus vasculaires;

4° La transmission de la maladie par les tiques;

5° Le danger qu'il y a à faire passer les animaux des zones indemnes dans les zones infectées;

6° La virulence possible du sang des animaux élevés dans les zones infectées, même quand ils sont sains en apparence, et celle des tiques qu'ils hébergent;

7° La sensibilité des bovidés adultes et la presque indifférence des très jeunes à l'action du Piroplasma;

1. Ce travail vient aussi de paraître dans la *Revista Veterinaria* de Buenos-Aires.

8° La non inoculabilité de la Tristeza aux lapins, cobayes, moutons et pigeons.

Avec Nicolle et Adil Bey, j'ai constaté la persistance du piroplasma dans les tissus des bovidés infectés depuis longtemps.

Je fais voir en outre :

A. Que l'immunité consécutive à une première atteinte est très solide.

B. Que l'examen du sang, quoique étant l'élément le plus important du diagnostic *ante-mortem*, reste parfois en défaut.

C. Qu'en effet, il existe une forme atypique de la maladie dans laquelle la perte globulaire est peu accentuée ou tout à fait tardive, et où les globules de la grande circulation ne sont pas envahis par le *Piroplasma* ou le sont seulement à l'approche de la mort.

D. Que cette forme ne correspond pas à la maladie bénigne; dans cette dernière, en effet, l'infection globulaire et la destruction des hématies s'accusent dès le début du mal, tout en restant peu importantes.

E. Que la forme bénigne n'est pas causée par des hématozoaires punctiformes, comme le pensaient Smith et Kilborne, mais toujours par le *Piroplasma* type.

A tous ces faits, j'ajoute encore :

a). Des données nouvelles sur l'évolution du *Piroplasma bigeminum*;

b). La culture à l'étuve du *Piroplasma bigeminum* sous sa forme ronde;

c). Un essai de l'interprétation raisonnée de l'immunité et du rôle intime des tiques ;

d). La manière d'être de la « Tristeza » dans la République Argentine;

e). L'inefficacité absolue des compositions quiniques ou arsénicales comme moyen préventif ou curatif[1].

Enfin, depuis la publication de mon travail, j'ai réussi à

1. J'ai administré la quinine à doses massives, jusqu'à 30 grammes, par le tube digestif et surtout par injection sous-cutanée. J'ai répété deux, trois et quatre fois les injections, même au point de vue préventif, sans jamais constater une action quelconque soit sur le parasite, soit sur la marche de la maladie.

Si van Hellens a obtenu de bons résultats, c'est ou bien qu'il a eu justement affaire, au moment de ses essais, à des formes qui eussent guéri toutes seules, ou bien que l'affection qui frappe les bœufs en Finlande est différente de la fièvre du Texas et de la « Tristeza ».

obtenir l'atténuation du *Piroplasma bigeminum* et la vaccination pratique contre la Tristeza.

Je ne puis évidemment pas ici développer, même sommairement, tous les points que je viens d'indiquer. Ce serait beaucoup trop long. Je demande cependant la permission de m'arrêter un instant sur l'évolution et la culture du *Piroplasma bigeminum*, et sur la vaccination contre la Tristeza.

Lorsqu'on examine du sang infecté : 1° à l'état frais sur la platine chauffante ; 2° sur des préparations colorées, surtout par la méthode de Laveran, et faites à des temps variables après la prise, voici ce qu'on constate :

Le *Piroplasma* endoglobulaire piriforme, unique ou bigéminé, prend rapidement une forme ronde par rétraction du protoplasma et ne tarde pas à sortir du globule. Si le sang examiné est extrêmement riche en parasites, on peut trouver des formes en poire, libres dans le sérum et munies d'un *flagellum* à leur partie effilée.

Dans le sang conservé purement à l'étuve, après vingt-quatre heures, presque tous les parasites sont arrondis, paraissent plus petits et se colorent mieux par le bleu de méthylène. A partir de ce moment, il faut toujours examiner des préparations colorées.

On sait qu'à l'aide de l'excellente méthode préconisée par M. Laveran, on met très facilement en évidence, dans les formes en poire (1er stade), une masse chromatique qu'il a décrite avec M. Nicolle sous le nom de karyosome. Or au moment où le parasite vient de prendre la forme ronde (2e stade), on ne réussit généralement plus à colorer ce karyosome : il semble bien s'être échappé hors du *Piroplasma*.

Les jours suivants, et parfois dans les 36-48 heures, la masse chromatique se reforme dans le parasite rond, puis se divise par scissiparité en 2, 3, 4 et même 5 petits éléments dont beaucoup sont d'un volume plus restreint que n'importe lequel des microbes colorables connus (3e stade).

Jusqu'ici, j'ai vainement cherché à voir la division du protoplasma suivre celle des petites masses chromatiques pour donner de nouveaux parasites. J'ai vu, au contraire, chacun de ces petits éléments chromatiques devenir libre, soit avant, soit surtout après la destruction plus ou moins lente du protoplasma du parasite ; il est probable qu'ils se sont entourés d'une

même couche protoplasmique; mais jusqu'ici il m'a été difficile de la distinguer avec sûreté.

Il est important de noter qu'après leur mise en liberté, les petites masses chromatiques peuvent encore se diviser par scissiparité.

J'ai pu suivre toutes ces transformations dans l'estomac de la Tique.

A mon avis, ce sont ces petits éléments libres qui, jetés comme des graines hors du parasite, sont chargés de perpétuer l'espèce. Ils représentent ainsi une forme de résistance; c'est la raison pour laquelle je les ai désignés sous le nom de spores ou de germes, à défaut d'autre nom plus approprié.

Je ne veux pas nier qu'il puisse exister une autre évolution; celle que je viens de décrire est normale; elle se fait dans l'organisme même des malades.

On peut obtenir de la façon suivante une véritable prolifération du *Piroplasma bigeminum*. Lorsqu'on dispose d'un sang très riche en hématozoaires, on en recueille purement une certaine quantité qui est défibrinée à l'abri de toute souillure, puis distribuée dans 20 ou 40 tubes à essais stérilisés, lesquels sont ensuite placés à l'étuve ou laissés à la température du laboratoire. Les jours suivants, on examine après coloration le fond des tubes. Dans la plupart des tubes, on constate que les hématozoaires disparaissent peu à peu; mais dans quelques autres on voit au contraire se dérouler l'évolution décrite plus haut. Après 10, 20, 30 jours au plus, on obtient une prolifération évidente des masses chromatiques, qui deviennent très nombreuses, libres, puis constituent les germes.

En réensemençant le fond de cette première culture, dans un autre tube contenant du sérum fortement hémoglobinémique, j'ai vu la prolifération continuer à se faire jusqu'à la cinquième culture.

La troisième culture, c'est-à-dire le troisième réensemencement dans le sérum hémoglobinémique, m'a donné une prolifération remarquable du parasite.

Là j'ai vu les germes grossir, former une petite masse arrondie, analogue au parasite rond précédemment indiqué, dans l'intérieur de laquelle apparaissait bientôt une masse chromatique qui, mise en liberté, donnait rapidement un nouveau parasite rond.

Le plus souvent, il y avait deux germes dans chaque parasite.

Jamais je n'ai constaté de forme en poire : celle-ci doit être particulière aux parasites endoglobulaires.

Je n'ai pas besoin de dire que ce développement du *Piroplasma bigeminum* ne réussit dans aucun des milieux de culture ordinaires, bouillons, gélose, gélatine, pas même sur le sang coagulé.

Aujourd'hui je puis donner la « Tristeza » avec des cultures de ce genre datant de 50 et 60 jours ; des essais ultérieurs pourront sans doute reculer encore ces limites.

Pour ce qui est de l'atténuation du *Piroplasma bigeminum*, je ne puis en ce moment indiquer exactement comment je procède ; toutefois je crois pouvoir dire en substance que le succès de mes recherches sur ce point est dû :

1° A l'emploi d'un sang dont la grande richesse en hématozoaires est toujours sensiblement constante. Ce virus est obtenu à la suite d'une série de passages par le bœuf ;

2° A ce fait que le *Piroplasma bigeminum* ne passe pas brusquement de la vie à la mort, mais peut subir des atténuations de sa virulence, pendant lesquelles son inoculation confère l'immunité.

Je me sers pour vacciner d'une culture dans le sang défibriné des malades. Ce sang contient bien le *Piroplasma* vivant, car, inoculé en quantité convenable à un bœuf, il peut lui donner la Tristeza : nous n'avons donc pas affaire seulement à un sérum.

Avant mes propres recherches, on a préconisé en Australie et au Texas des vaccinations contre la fièvre du Texas. Elles consistent à injecter sous la peau 5 c. c. de sang défibriné de malades guéris depuis peu.

Dans ces conditions le sang a une composition dont on n'est pas maître. Parfois il contient des hématozoaires capables de donner la maladie mortelle : d'autres fois il ne contient pas d'hématozoaires, ou il en contient si peu qu'il peut ne transmettre ni la maladie ni l'immunité. L'étude détaillée que j'ai faite du sang des animaux guéris explique bien ces phénomènes.

Je ne veux pas dire que ce procédé ne puisse donner aucun résultat utile dans la pratique ; mais je le considère comme pouvant être dangereux, surtout pour les animaux de race pure. J'en ai fait l'expérience. En effet l'immunité n'est acquise qu'à

la faveur d'une attaque bénigne du mal, c'est-à-dire après l'apparition de signes extérieurs appréciables. Or rien n'est plus fréquent que de dépasser cette limite et de provoquer une affection grave. Au contraire, avec la méthode que je préconise, on peut obtenir une vaccination véritable à la suite de laquelle l'animal ne présente aucun symptôme apparent.

Voici le résumé de deux expériences publiques instituées pour démontrer l'efficacité de cette vaccination.

1° Expériences de Buenos-Aires, suivies par une Commission présidée par M. le ministre de l'Agriculture de la République Argentine.

Deux sous-commissions étaient chargées, l'une des recherches microscopiques, l'autre des examens cliniques des animaux.

Le 15 avril, la commission choisit 11 animaux dans un lot de 25 bovidés provenant de localités indemnes de « Tristeza ».

Sur ce nombre, 8 reçoivent dans la jugulaire une petite quantité de vaccin dilué et n'éprouvent de ce fait aucun malaise. Deux autres, inoculés avec du sang virulent pour montrer la sensibilité des animaux à la maladie, prirent régulièrement la forme grave; l'un d'eux mourut. Enfin le dernier, qui avait reçu 1 c. c. de vaccin dans la jugulaire pour montrer la présence du piroplasma vivant dans ce vaccin, prit la maladie et guérit.

Le 30 avril, 7 des bovidés vaccinés le 15 avril, plus deux taureaux vaccinés depuis quatre mois et quatre témoins, reçurent sous la peau 10 c. c. de sang très virulent; de plus le huitième vacciné et un cinquième témoin furent couverts de jeunes tiques écloses au laboratoire et provenant de localités infectées. Huit jours après, les quatre témoins étaient morts, après avoir présenté une température très élevée, de l'hémoglobinurie, une grande quantité d'hématozoaires dans les globules, une énorme diminution du nombre des hématies, et toutes les lésions de la « Tristeza » à l'autopsie.

Aucun des vaccinés n'a paru malade. Des animaux couverts de Tiques, le vacciné restait bien portant, tandis que le témoin était malade dès le 10 mai et mourait le 18 du même mois.

2° Expériences d'Alfort, suivies par une commission de la Société centrale de Médecine Vétérinaire et par plusieurs membres de l'Institut Pasteur.

Le 5 juillet un bœuf et une vache sont vaccinés par injection intraveineuse; par la suite ils ne montrent aucun malaise appréciable.

Le 15 du même mois, ces deux vaccinés, ainsi que deux vaches ayant présenté un et deux mois avant une forme bénigne de la maladie, sont inoculés par M. Nocard avec 5 c. c. de sang virulent injecté sous la peau. Un bœuf témoin reçoit la même inoculation.

Dès le 21, la température du bœuf témoin augmente de deux degrés, elle atteint 40°,4; ses globules sont encore en nombre normal, 8,000,000.

Le 22, la température est à 40°,7, l'urine est rouge, on trouve facilement des hématozoaires, l'animal est triste, complètement inappétent. A 11 heures du matin, il a 3,200,000 globules rouges par m. c. A 4 heures, on en compte seulement 1.100.000. Les autres bovidés vont très bien.

Le 23, l'hémoglobinurie est très intense, le sérum du sang, les hématozoaires sont nombreux. T = 41°,2; on ne compte plus que 370,000 globules. Le sujet semble sur le point de mourir; il est très faible, sans aucun appétit.

Le 24, l'état du malade semble s'être amélioré; le soir, la température descend à 38.3, les hématozoaires deviennent rares, l'urine est encore un peu rouge.

Le 25, l'urine est de teinte normale; la température est de 38°,4; le malade, quoique extrêmement faible et amaigri, prend le chemin de la convalescence.

Les autres bovidés n'ont présenté à aucun moment le plus petit signe de maladie, la température est restée parfaitement normale ainsi que la composition du sang et les grandes fonctions [1].

1. Pour plus de détails consultez encore :

La Tristeza en la République Argentina. Revista Veterinaria, Enero 31 a Mayo 31 de 1900.

Expériences de vaccination contre la Tristeza faites à Alfort. Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire. Séances des 12 et 26 juillet 1900.

Sur la Tristeza. Comptes rendus du Congrès international de médecine 1900.

Expériences officielles de vaccination contre la Tristeza à Buenos-Aires. Recueil de médecine vétérinaire, nos du 15 octobre et suivants, 1900.

La Tristeza dans la République Argentine. Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire, nos du 30 novembre et suivants, 1900.

LÉGENDE DE LA PLANCHE VI

Fig. 1. — *Piroplasma bigeminum.*
Forme en poire.

Fig. 2. — *Piroplasma bigeminum.*
Sous différents aspects.

Fig. 3. — *Piroplasma bigeminum.*
Forme ronde.

Fig. 4. — *Piroplasma bigeminum.*
Forme ronde.

Fig. 5. — *Piroplasma bigeminum.*
Formation des germes.

Fig. 6. — *Piroplasma bigeminum.*
Culture artificielle en sérum hémoglobinémique.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE MARS 1901 N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA COAGULATION DU SANG ET LES SÉRUMS ANTICOAGULANTS

PAR LES Drs JULES BORDET ET OCTAVE GENGOU.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

L'étude de l'immunité, et notamment des caractères acquis par les organismes à la suite de la vaccination, a fait progresser nos connaissances dans des directions diverses. Ce qu'on attendait surtout de cette étude, c'est qu'elle nous permît de suivre, dans ses péripéties intimes, la lutte de l'organisme contre ses envahisseurs. Mais ses enseignements ne se sont point bornés là. Elle nous a apporté, en outre, beaucoup de notions nouvelles ou plus précises, dont la physiologie générale a profité. Parmi les services qu'elle a rendus, citons-en un : elle a fourni des réactifs très délicats pour reconnaître les espèces.

Pour ce qui concerne les espèces microbiennes, ces réactifs sont pratiquement d'un réel secours, et il y a des cas où il serait malaisé, quand on veut distinguer l'une de l'autre deux espèces microbiennes voisines, de se passer du sérodiagnostic.

Pour ce qui concerne les espèces animales, l'étude des propriétés des sérums corrobore, d'une manière très démonstrative, l'idée que les divers animaux diffèrent entre eux non seulement par leur aspect et leur conformation, mais même par les détails les plus intimes de leur constitution chimique. Le microscope confond les hématies du lapin et celles du cobaye. Pourtant, entre ces cellules si semblables, l'action des sérums normaux (Daremberg, Buchner) et surtout, ainsi que l'un de nous l'a montré, celle des sérums hémolytiques spécifiques, révèle des différences tranchées.

Les sérums spécifiques peuvent donc reconnaître la provenance de cellules telles que les hématies, les spermatozoïdes, etc. Mais ce qu'ils peuvent faire quand il s'agit d'éléments cellulaires, ils le peuvent encore, au moins dans certains cas, lorsqu'il s'agit de substances chimiques : ils permettent d'en préciser l'origine. On sait que si l'on injecte à un animal A le sérum d'une espèce différente B, le sérum de l'animal traité, extrait après un certain temps, produit un précipité volumineux, de nature albuminoïde, dans ce sérum d'espèce B. Ce fait a été constaté pour la première fois par Tchistovitch, et l'un de nous, qui en a observé divers exemples, a montré que cette propriété précipitante revêt, sinon d'une manière absolue, au moins nettement, le caractère de la spécificité [1]. Il en résulte que cette propriété peut déceler, entre divers sérums, des différences de constitution chimique sûrement très délicates, et que les procédés habituels laisseraient inaperçues.

Des faits analogues s'ajoutèrent bientôt à celui que nous venons de mentionner. Par exemple, le lactosérum [2] qui — les lecteurs de ces *Annales* s'en souviennent — agglutine en flocons la caséine du lait, peut faire distinguer l'origine du lait soumis à l'expérience. En effet, M. Fisch [3], MM. Wassermann et Schütze [4], qui ont repris l'étude de ce lactosérum, ont montré que si ce dernier provient d'un animal injecté de lait d'espèce A, il n'agit pas sur des laits fournis par des espèces B ou C.

Le sérum d'animaux traités préalablement par des injections de blanc d'œuf donne lieu à des observations analogues, ainsi que M. Uhlenhuth l'a démontré [5].

Dans le même ordre d'idées, des expériences relatées il y a un an dans ces *Annales* [6] ont fait voir que cette matière bactéricide et cellulicide, l'alexine, qui existe dans les sérums frais, n'est pas identique chez les différentes espèces animales. En effet, une antialexine qui neutralise l'alexine de cobaye, par exemple, n'exerce pas d'influence sur les alexines de lapin, de rat, de chèvre, etc.

1. Bordet, Ces *Annales*, mars et avril 1899.
2. *Ibidem.*
3. Fisch, Studies on lactoserum and on other cell-sera. *St-Louis Courier of med.* Feb. 1900.
4. *Deutsche med. Wochenschr. Vereinsbeilage*, 1900, n° 30.
5. *Deutsche med. Wochenschr*, 1900, n° 46.
6. Bordet, Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques, ces *Annales*, mai 1900.

Nous nous sommes demandé si les espèces animales se distinguent encore les unes des autres par la nature du fibrinferment que le sérum possède, et si l'on peut, par des procédés analogues à ceux qui permettent la préparation des antialexines, obtenir des sérums actifs contre le principe qui préside à la coagulation du sang, qui provoque la transformation du fibrinogène en fibrine concrète. Le sujet que nous abordons touche donc, d'une part, à l'étude de la coagulation, et, d'autre part, à celle des propriétés du sérum chez les organismes vaccinés.

Nous commencerons par décrire, dans leur préparation et leurs propriétés, deux plasmas dont nous nous servons dans les expériences que nous avons à résumer.

*
* *

§ Ier. *Préparation et propriétés des plasmas d'oie et de lapin.* — Pour réaliser nos expériences, nous avions besoin de sang non coagulé, dépourvu de cellules, et qu'on pût conserver assez longtemps sans que la prise en caillot intervînt. Il nous fallait, en d'autres termes, des plasmas non ou lentement coagulables, et, en outre, ne contenant aucune substance étrangère.

Plasma d'oie. — On obtient facilement, grâce aux recherches de M. Delezenne[1], du plasma d'oie qui ne subit que très tardivement la coagulation spontanée. Ce savant a montré que le sang d'oiseau ne se coagule que très lentement lorsqu'il est *pur*, c'est-à-dire *non mélangé à du suc de tissus lésés*[2]. Pour réaliser cette condition, il faut, lorsqu'on saigne l'animal, introduire la canule dans l'artère préalablement bien nettoyée, éviter de racler les parois du vaisseau. Le sang obtenu est centrifugé, et l'on obtient un plasma qui ne se coagule pas spontanément (au moins pendant un temps qui peut dépasser un mois) mais qui se prend en caillot si on l'additionne d'une quantité même très minime de suc de tissu broyé (par exemple de tissu musculaire écrasé).

Dans la pratique, nous préparions le plasma d'oie sans même devoir recourir aux précautions si minutieuses sur lesquelles

1. Delezenne, *Archives de Physiologie*, 1897.

2. Ce fait est exact non seulement pour le sang des oiseaux, mais aussi, comme M. Delezenne l'a fait voir, pour le sang de tous les Vertébrés à globules rouges nucléés (oiseaux, reptiles, batraciens, poissons).

M. Delezenne insiste. Nous introduisions dans la veine de l'aile la pointe effilée, recourbée en bec, d'un tube de verre de calibre assez gros, stérilisé, garni d'un tampon d'ouate à son orifice supérieur. Le sang monte dans le tube assez rapidement; lorsque la quantité recueillie est suffisante, on retire le tube du vaisseau, on laisse couler librement les premières gouttes de sang qui s'échappent par l'extrémité pointue; la portion de sang qui s'écoule ensuite est recueillie dans des tubes que l'on centrifuge. Mais on n'utilise pas la dernière portion, celle qui représente le sang qui a pénétré dans le tube aussitôt après la perforation de la veine par l'effilure. Ce sang a pu, en conséquence, se mêler à une trace de suc provenant de la plaie ou de la lésion vasculaire, et acquérir ainsi la propriété de se coaguler à bref délai.

De fait, on constate en général que cette partie du sang recueilli se prend en caillot assez rapidement. Au contraire, le sang placé dans les tubes à centrifuger ne se modifie que lentement et fournit un plasma presque indéfiniment liquide.

Il va de soi qu'il faut se garder, pendant l'opération, d'incliner brusquement ou d'agiter le tube à saigner dans lequel le sang pénètre : il importe, en effet, d'éviter le mélange de la portion qui a passé la première, avec celles que la veine fournit dans les instants qui suivent.

La centrifugation, qui doit s'effectuer le plus rapidement possible, scinde le sang obtenu en deux couches, que l'on sépare par décantation. La supérieure constitue le plasma qui, bien débarrassé de cellules, reste liquide très longtemps, ainsi qu'il vient d'être dit. L'inférieure, la couche globulaire, se coagule en général après quelques heures [1].

Théoriquement, on n'est pas autorisé à admettre que le plasma ainsi obtenu soit entièrement dépourvu de ferment de la fibrine. Cependant la dose de cette matière qui y est contenue doit être extrêmement minime, tout à fait négligeable pratiquement, puisque la coagulation spontanée ne survient pas.

1. Ce fait témoigne de ce que le fibrin-ferment est exsudé par les cellules sanguines, spécialement par les leucocytes, ainsi qu'on l'admet très généralement. Il est probable que, dans le cas du sang d'oiseau, cette excrétion se fait avec une remarquable lenteur, ce qui permet, grâce à l'éloignement rapide des cellules, la préparation d'un plasma incoagulable. Nous n'abordons pas, dans le présent article, la question de l'origine du ferment de la fibrine.

Ce plasma, riche en fibrinogène, constitue un excellent réactif du fibrin-ferment. Il se coagule en effet rapidement lorsqu'on l'additionne de doses même faibles de sérum frais de divers animaux (cobaye, lapin, mouton, chien, etc...) ; le sérum de poule, d'oie, ne le fait coaguler, en général, qu'avec une certaine lenteur, ce qui résulte de la faible teneur du sang d'oiseau en ferment de la fibrine.

Plasma de lapin. — Tandis qu'on obtient facilement, sans user d'artifices particuliers, un plasma d'oie riche en fibrinogène, mais dépourvu à peu près totalement de fibrin-ferment, et qui, par conséquent, ne coagule pas spontanément, nous n'avons pu réussir à préparer un plasma de lapin qui ne contînt pas la substance active coagulante. Le plasma de lapin, dont nous allons indiquer brièvement la préparation, contient toujours du fibrin-ferment, est donc apte à la coagulation spontanée, mais parfois, ainsi qu'on va le voir, avec un retard considérable.

On sait que Freund a montré que le sang se coagule très lentement lorsqu'on le recueille dans un vase dont les parois ont été préalablement enduites d'huile ou de vaseline. Nous avons tenté de centrifuger, sans qu'il se coagulât, du sang contenu dans un tube intérieurement vaseliné ; nous avons échoué, et la cause de cet insuccès fut que l'adhérence de la vaseline à la paroi de verre est tout à fait insuffisante. Nous eûmes recours alors à des tubes dont les parois intérieures étaient recouvertes d'une couche de paraffine.

On introduit dans des tubes (préalablement stérilisés) un peu de paraffine fondue, stérile, qu'on fait couler sur la paroi de manière à l'enduire complètement ; on refroidit ensuite brusquement en plongeant le tube dans l'eau froide.

Le tube dont on se sert pour saigner le lapin (tube semblable à celui que nous avons décrit plus haut à propos du plasma d'oie) est soigneusement paraffiné ; on en introduit l'extrémité pointue dans la carotide, bien isolée et cautérisée au préalable. Quand le tube est plein, on le retire du vaisseau, on perd les premières gouttes de sang, on laisse couler ensuite dans des tubes à centrifuger, paraffinés également, et l'on n'utilise pas la dernière portion, qui pourrait contenir des débris de l'artère.

On constate que le sang de lapin, recueilli dans de telles conditions, et abandonné à lui-même dans les tubes paraffinés, ne s'y coagule qu'avec une lenteur tout à fait inusitée. On a donc le temps de le centrifuger; cette opération doit être assez rapide. Il est préférable de baigner les tubes dans de l'eau froide pendant leur séjour à la centrifuge. Lorsque, sous l'influence de la centrifugation, le tiers supérieur du liquide est devenu limpide, on décante cette couche de plasma en se servant, à cet effet, d'une pipette à boule, paraffinée intérieurement; on verse le liquide dans un tube paraffiné, qu'on soumet à une nouvelle centrifugation. On décante de nouveau et on conserve le plasma, bien dépourvu de cellules, dans un tube paraffiné.

Ce plasma, gardé en tube paraffiné, finit toujours par se coaguler spontanément, même lorsqu'il est complètement dépourvu de cellules: il contient donc du fibrin-ferment. Le temps pendant lequel on peut le conserver à l'état liquide, à la température du laboratoire (15-20°) varie beaucoup, et peut aller jusqu'à 24 ou 30 heures. Parfois la prise en caillot survient notablement plus vite, après 4 ou 5 heures par exemple ; il paraît y avoir, à cet égard, des différences individuelles fort marquées entre divers échantillons de sang de lapin.

Ce plasma qui renferme la substance coagulable, le fibrinogène, et le principe coagulant, le fibrin-ferment, donne lieu à une observation intéressante. Alors qu'il reste très longtemps liquide tant qu'on le conserve en tube paraffiné, il se solidifie en *quelques minutes* lorsqu'on le verse dans un tube de verre ordinaire, même lorsque la paroi de ce tube a été soigneusement nettoyée. Le contact avec une surface de verre non enduite de paraffine, joue donc, au point de vue de la prise en caillot, un rôle accélérateur tout à fait remarquable.

Pourquoi le sang se coagule-t-il si lentement quand on le reçoit dans un tube paraffiné? On sait que le sang ne mouille pas la paraffine. Deux hypothèses se présentent à l'esprit pour expliquer l'influence retardante de cette substance. *a*) Ou bien cette substance ne provoque pas, *sur les cellules* (spécialement sur les leucocytes, sources du fibrin-ferment) l'effet de contact que la généralité des corps (tels que le verre) sont à même de produire; on peut supposer que les cellules productrices du ferment sont, soit excitées,

soit plus ou moins avariées, par le contact avec les corps étrangers, impression d'où résulte la mise en liberté du fibrin-ferment. La paraffine n'exercerait pas cette influence, parce qu'elle n'est pas mouillable. *b*) Ou bien le contact avec un corps tel que le verre agit, *non pas sur les cellules*, mais *sur les substances* qui président à la coagulation, c'est-à-dire sur le fibrinogène ou le fibrin-ferment. Il y aurait là un fait non pas biologique, mais physique, rentrant vraisemblablement dans la catégorie des phénomènes d'adhésion moléculaire.

Nous ne pouvons démontrer que la première hypothèse soit inexacte. Il est fort possible qu'elle contienne une part de vérité. Il convient cependant de faire remarquer que, comme il vient d'être dit, le contact avec le verre fait coaguler un plasma bien centrifugé, dépourvu de cellules. Quant à la seconde hypothèse, on peut démontrer qu'elle est exacte, ainsi qu'il ressort de l'expérience suivante.

On prend une lame de verre dont une partie de la surface est à nu, dont l'autre est recouverte d'une fine couche de paraffine. D'un tube paraffiné contenant du plasma de lapin, récemment préparé, on aspire, dans une pipette paraffinée, un peu de liquide. On en laisse tomber deux gouttes sur la lame : l'une sur la surface paraffinée, l'autre sur le verre laissé à nu. On place la plaque dans une chambre humide, pour prévenir l'évaporation. Au bout de quelques minutes, on constate que la goutte placée sur la paraffine ne s'est nullement modifiée. Il n'en est pas de même pour la goutte qui repose sur la surface de verre : cette surface s'est rapidement tapissée d'une fine couche grise, d'abord très mince, adhérant entièrement à la paroi, et qui bientôt s'épaissit. A ce moment, on touche avec un tube capillaire, ouvert aux deux extrémités, la partie supérieure de la goutte ; à ce niveau, le plasma, qui n'a pas ressenti directement le contact du verre, est encore liquide et pénètre dans le tube fin, où bientôt il se coagule entièrement. Par cette aspiration, on réduit la goutte à la partie qui s'est déjà coagulée, et qui est appliquée étroitement à la surface de la lame. Cette dernière, recouverte de sa membrane de fibrine, est alors placée sous le microscope. On distingue le treillis des fins filaments fibrineux avec de très petites granulations assez réfringentes, mais on n'aperçoit point de cel-

lules. Quant au plasma maintenu au contact de la paraffine, il reste liquide pendant plus de vingt heures. Le lendemain on peut encore en retirer du tube paraffiné, et le faire coaguler en quelques minutes par le contact avec une surface de verre.

En raison de ce fait, qu'un même plasma, dans les mêmes conditions de température, en l'absence de cellules, se comporte aussi diversement suivant la nature du corps avec lequel il se trouve en contact, il nous paraît certain qu'un phénomène purement physique joue un rôle important dans la coagulation.

Les deux plasmas que nous venons de considérer diffèrent profondément. L'un, le plasma d'oie, est pratiquement dépourvu de fibrin-ferment; il peut être conservé dans des tubes ordinaires : l'autre, le plasma de lapin, contient cette matière coagulante; on ne peut en retarder la coagulation qu'en le maintenant dans des tubes paraffinés. C'est le premier de ces plasmas qui nous servira comme réactif du ferment de la fibrine.

*
* *

§ II. — *Sérums « anticoagulants ». Action de ces sérums sur le fibrin-ferment. Spécificité de cette action.* — Nous considérerons d'abord le sérum de cobayes injectés préalablement, à plusieurs reprises, soit de sérum, soit de plasma de lapin. Nous montrerons que ce *sérum de cobaye empêche la coagulation du sang de lapin*, et que cette influence antagoniste est due, pour une très grande part, à la *neutralisation du fibrin-ferment de lapin.*

Les cobayes dont nous allons étudier le sérum avaient été préparés, les uns par trois injections, pratiquées à huit jours d'intervalle environ, de 5 c. c. de sérum frais de lapin neuf. Les autres avaient reçu des injections de plasma de lapin. On préparait ce plasma de la manière suivante : on recevait le sang de lapin, au sortir de l'artère, dans une petite quantité de solution d'oxalate de soude[1], à dose calculée de manière à donner au volume du sang recueilli une teneur en ce sel égale à 1,5 0/00.

Ce sang incoagulable, soumis à la centrifugation, four-

1. On le sait, ce sont MM. Arthus et Pagès qui ont étudié ces plasmas oxalatés. Ils ont montré que ces derniers se coagulent rapidement lorsqu'on les additionne de chlorure calcique.

nissait du plasma. Ce dernier était ensuite additionné d'une quantité convenable de chlorure de calcium, qui, on le sait, fait coaguler ce plasma oxalaté. Immédiatement après cette addition, avant la prise en caillot (laquelle ne s'effectue qu'après une dizaine de minutes), on injectait le liquide, à dose de 5-6 c. c., sous la peau de cobayes, où la coagulation s'opérait bientôt. Grâce à cette technique, les cobayes recevaient ainsi de la fibrine concrète, mélangée de fibrin-ferment[1].

On saigne ces cobayes douze jours environ après la dernière injection. Les sérums étaient toujours utilisés le lendemain ; il y a lieu de craindre en effet que la conservation n'altère le fibrin-ferment que ces sérums renferment.

Au moment où nous terminions nos expériences, M. Camus[2] a publié un travail dans lequel il décrit des sérums anticoagulants, obtenus par des procédés semblables à ceux que nous avons mis en œuvre. Mais il admet que ces sérums agissent grâce à la présence d'un anticorps capable de précipiter le fibrinogène et de lui enlever ainsi son aptitude à la coagulation.

Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, l'interprétation de M. Camus repose sur un fait exact. Mais on peut, par une analyse détaillée, montrer que ces sérums empêchent la coagulation, bien plus parce qu'ils annihilent le fibrin-ferment que parce qu'ils modifient le fibrinogène.

Aussi décrirons-nous immédiatement l'expérience destinée à montrer que le sérum de *cobayes* injectés préalablement de sérum ou de plasma de *lapin*, neutralise le fibrin-ferment contenu dans le sang ou le sérum frais de *lapin*. — Le principe de cette expérience est le suivant :

Le plasma d'oie récemment préparé, incoagulable spontanément, se prend rapidement en caillot lorsqu'on l'additionne d'un sérum frais, tel que celui de lapin ou de cobaye. On démontre aisément que ces sérums perdent entièrement leur propriété

1. Nous tenions à injecter aux animaux de la fibrine concrète. Nous espérions en effet, au début de nos recherches, que les cobayes, en s'habituant à résorber cette fibrine injectée, nous fourniraient un « sérum fibrinolytique », capable de dissoudre un caillot de fibrine de lapin. Cet espoir ne s'est nullement réalisé. Le sérum obtenu ne modifie pas un caillot fibrineux de lapin, même petit et très lâche, soit à la température ordinaire, soit après un long séjour à 37°. M. Camus a fait identiquement la même constatation pour des sérums obtenus par des moyens fort semblables; il n'a pu observer de fibrinolyse.

2. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1901.

coagulante lorsqu'on les chauffe pendant 3/4 d'heure à 58°,5[1]. Si l'on prépare un mélange de sérum non chauffé de lapin et de sérum de cobaye *neuf*, préalablement chauffé à 58°,5, et qu'on ajoute du plasma d'oie, ce dernier se coagule, grâce à la présence du sérum non chauffé de lapin, que ce mélange renferme. On peut, d'autre part, préparer un second mélange, contenant encore du sérum non chauffé de lapin neuf, mais qui, au lieu de sérum de cobaye *neuf* (chauffé au préalable à 58°,5), renferme du sérum (chauffé au préalable à 58°5,) de *cobaye traité*. Si ce dernier mélange est impuissant à faire coaguler le plasma d'oie — et c'est en effet ce qui arrive — on en conclut que le fibrin-ferment de lapin a été rendu inactif par le sérum de cobaye préparé. Ce dernier sérum contient donc un anticorps du fibrin-ferment, anticorps qui résiste à la température de 58°,5[2]. — Pour que l'expérience soit décisive, il faut qu'elle comprenne divers essais de contrôle : c'est pourquoi nous l'exposerons en détail :

On saigne trois animaux : un cobaye neuf, un lapin neuf, un cobaye qui a été injecté antérieurement de sérum frais ou de plasma de lapin. Le lendemain, les sérums obtenus sont débarrassés des globules par la centrifugation et sont ensuite partagés chacun en deux portions, dont l'une est gardée telle quelle, dont l'autre est chauffée pendant 3/4 d'heure à 58°,5. Nous avons donc, de chacun des trois sérums, deux doses, dont l'une a conservé son fibrin-ferment, dont l'autre en a été dépouillée par le chauffage. On répartit ensuite ces sérums, seuls ou en mélange, dans plusieurs séries de tubes, de la manière suivante :

Série A. Elle comprend trois tubes : *a*) contient 1/10 de c. c. de sérum, non chauffé, de lapin neuf ; *b*) 1/10 de c. c. de sérum, non chauffé, de cobaye neuf ; *c*) 1/10 de c. c. de sérum, non chauffé, de cobaye traité.

Série B. Elle comprend 3 tubes : *a*) contient 6/10 de c. c. de sérum, chauffé à 58°,5, de lapin ; *b*) 6/10 de c. c. de sérum, chauffé à 58°,5, de cobaye neuf ; *c*) 6/10 de c. c. de sérum, chauffé à 58°5, de cobaye traité.

Série C. Elle consiste en trois tubes, contenant chacun, comme ceux de la série A, 1/10 de c. c. de chaque sérum, non chauffé. Mais on introduit ensuite dans chacun de ces tubes 6/10 de c. c. de sérum de cobaye neuf, chauffé au préalable à 58°,5.

Série D. Les trois tubes renferment aussi 1/10 de c. c. de chacun des sérums non chauffés. Mais, au lieu d'ajouter du sérum chauffé de cobaye neuf, on introduit 6/10 de c. c. de sérum, chauffé à 58°,5, de cobaye traité.

1. Le fait que le chauffage à 55°-58° détruit le fibrin-ferment, est connu depuis longtemps (Hayem, Schmidt).

2. On sait que les antialexines et en général les antitoxines, résistent à des températures très notablement supérieures à 58°,5.

Série E. Les trois tubes contiennent encore 1/10 de c. c. de chacun des sérums non chauffés. En outre, ils renferment 6/10 de c. c. de sérum, chauffé à 58°5, de lapin neuf.

Lorsque la confection de ces tubes est terminée, on les additionne tous, au même moment, de 3/10 de c. c. de plasma d'oie, préparé depuis une ou deux heures, et on note l'instant où les coagulations se produisent.

Les tubes de la série A vont nous faire apprécier l'énergie coagulante qu'une dose de 1/10 de c. c. de chacun des sérums non chauffés manifeste vis-à-vis du plasma d'oie. Les tubes de la série B doivent nous donner la certitude que, même employé à doses assez fortes (6/10 de c. c.), chacun des sérums a totalement perdu, par le chauffage à 58°,5, le pouvoir de solidifier le plasma d'oie. Les séries C, D, E, nous indiqueront si les agents coagulants de chacun des trois sérums non chauffés, ou en d'autres termes, les trois fibrin-ferments employés, sont modifiés, dans leur énergie, par le contact préalable, soit avec les sérums neufs chauffés (cobaye, lapin), soit avec le sérum, également chauffé, provenant du cobaye traité.

Voici les résultats que donne une semblable expérience, répétée à diverses reprises :

Dans la série A, les plasmas se coagulent après un temps qui n'est pas absolument invariable, mais qui est toujours court (15 à 30 minutes). Les trois sérums frais sont donc activement coagulants; en particulier, le sérum de cobaye traité ne se distingue pas, comme activité, des sérums neufs de cobaye et de lapin. Ajoutons ici, incidemment, que divers sérums neufs, tels que ceux de chien, de mouton, se comportent d'une manière très analogue.

Les proportions choisies dans l'expérience (une partie de sérum pour trois parties de plasma) sont naturellement tout à fait arbitraires. La coagulation se fait rapidement aussi avec les doses inverses (trois parties de sérum, une partie de plasma).

Les tubes de la série B restent indéfiniment liquides. Le chauffage à 58°,5 détruit donc entièrement le fibrin-ferment [1].

Ajoutons qu'il en est de même pour les sérums que nous avons essayés dans d'autres expériences, tels que les sérums de chien et de mouton.

Série C. Les liquides contenus dans ces tubes coagulent quelques minutes après ceux de la série A. Par conséquent, les fibrin-ferments des sérums de cobaye neuf, cobaye traité, lapin neuf ne s'affaiblissent guère en se diluant dans 6/10 de c. c. de sérum chauffé de cobaye neuf.

Série E. La coagulation apparaît bientôt. Le sérum de lapin neuf, chauffé au préalable à 58°,5, ne s'oppose donc pas à l'action des fibrin-ferments.

Série D. Ici les divers mélanges se comportent très différemment. Le mélange de 1/10 de sérum non chauffé de lapin, de 6/10 de sérum chauffé de cobaye traité, et de plasma, *reste indéfiniment liquide*. Les deux autres tubes, qui contiennent, outre le plasma et le sérum chauffé de cobaye traité, l'un, 1/10 de c. c. de sérum non chauffé de cobaye neuf, l'autre 1/10 de c. c.

1. On s'assure, bien entendu, que le plasma employé, gardé sans mélange d'aucune sorte, reste liquide pendant les jours qui suivent l'expérience.

de sérum non chauffé de cobaye traité, se coagulent, mais avec un retard évident, néanmoins peu considérable (une heure et demie environ).

Énumérons les conclusions qui découlent soit de cette expérience, soit d'autres expériences analogues, complémentaires de la première, et dans lesquelles on fait intervenir, non seulement les sérums neufs de cobaye et de lapin, mais aussi ceux de chien et de mouton :

1° Si l'on ajoute, à du sérum neuf, non chauffé, contenant par conséquent du fibrin-ferment, une dose même assez forte (six fois plus grande) d'un sérum neuf (provenant soit de la même espèce, soit d'une espèce différente), chauffé préalablement à 58°,5, et dépourvu ainsi de tout pouvoir coagulant, l'activité du fibrin-ferment du sérum non chauffé ne subit pas d'affaiblissement notable. Les divers sérums neufs ne paraissent donc pas posséder (au moins pour les doses, assez fortes du reste, mises en œuvre dans nos expériences) de substances antagonistes des fibrin-ferments de diverses espèces animales.

2°) Le sérum de cobayes traités au préalable par trois ou quatre injections de 5 c. c. environ de sérum ou de plasma de lapin, neutralise le fibrin-ferment contenu dans le sérum de ce dernier animal. Néanmoins, pour enlever complètement, à une partie de sérum frais de lapin, sa propriété coagulante, il faut une quantité assez forte (six parties environ) de sérum actif de cobaye traité. Ce dernier, à dose de 3 parties seulement, affaiblit beaucoup le fibrin-ferment, sans l'annihiler entièrement.

L'action neutralisante est nettement spécifique, sans l'être néanmoins d'une manière absolue. Le sérum dont nous nous occupons, et qui, à dose convenable, neutralise complètement le fibrin-ferment du lapin, produit, à ces mêmes doses, un léger affaiblissement dans l'activité coagulante du sérum de cobaye. Chose assez curieuse, cet affaiblissement léger s'observe encore quand on mélange, au sérum actif, chauffé préalablement à 58°,5, le sérum, non chauffé, du même cobaye traité. — D'autre part, le sérum actif n'exerce qu'une influence plus minime encore sur le fibrin-ferment du chien, et paraît ne modifier nullement celui du mouton. Il résulte de là que les fibrin-ferments provenant d'espèces animales différentes, tout en présentant des caractères fort semblables, ne sont pas complè-

tement identiques. On s'en souvient, une conclusion toute pareille a été énoncée antérieurement (ces *Annales*, 1900) pour ce qui concerne les alexines.

3° Le sérum non chauffé de cobaye traité ne présente rien de particulier pour ce qui concerne son propre pouvoir coagulant vis-à-vis du plasma d'oie. Il ne se distingue pas, à cet égard, du sérum de cobaye neuf[1].

Puisque le sérum de cobaye traité s'oppose à l'action du fibrin-ferment de lapin, on doit prévoir que du sang ou du plasma de lapin, versé dans le sérum actif (préalablement chauffé à 58°,5) ne s'y coagule pas. C'est en effet ce qui arrive. Si l'on verse dans un tube contenant 1/2 c. c. de sérum actif de cobaye, quelques gouttes de plasma de lapin (obtenu par le procédé à la paraffine), le mélange reste indéfiniment liquide. Mais il se prend en caillot (avec un certain retard, nous reviendrons sur ce point ultérieurement) lorsqu'on l'additionne d'une dose suffisante de sérum frais de lapin. Le fibrin-ferment, qu'on introduit ainsi en quantité suffisante pour que l'influence antagoniste soit dépassée, produit son effet coagulant.

Nous avons répété l'ensemble de ces expériences en nous servant cette fois de sérum actif provenant de lapins injectés au préalable de sérum de cobaye. Les résultats sont analogues. Ce sérum neutralise le fibrin-ferment de cobaye; il n'agit pas sur le fibrin-ferment de lapin.

Si l'on verse, dans un tube contenant 7 c. c. de sérum de lapin *neuf*, (préalablement chauffé à 58°,5), 2 c. c. de sang de cobaye qu'on vient de recueillir dans un tube paraffiné, le mélange coagule normalement au bout d'une demi-heure[2]. — Mais la coagulation n'apparaît jamais si les 2 c. c. de sang de cobaye sont reçus dans 7 c. c. de sérum (préalablement chauffé) de lapin qui a été traité antérieurement par trois ou quatre injections de sérum de cobaye. Néanmoins le mélange coagule

1. Le chauffage à 58°,5 est donc nécessaire, dans ces expériences où le plasma d'oie intervient, pour qu'on puisse constater la propriété antagoniste que le sérum manifeste vis-à-vis du fibrin-ferment de lapin. C'est pour des raisons très analogues qu'il faut, pour étudier commodément les sérums antialexiques, les chauffer préalablement à 55°.

2. Ce temps de coagulation peut paraître un peu long. Mais il faut tenir compte de ce que le sang est dilué dans un volume assez considérable de sérum que le chauffage a rendu inerte.

très bien lorsqu'on l'additionne d'un volume suffisant de sérum de cobaye neuf. Par conséquent, si le mélange primitif restait liquide, c'était grâce à la neutralisation, par une substance antagoniste, du fibrin-ferment contenu dans le sang de cobaye.

*
* *

§ III. — *Action des sérums anticoagulants sur le fibrinogène.* Lorsqu'on verse dans 1 c. c. de sérum de cobaye neuf, frais et non chauffé, une certaine dose (2/10 de c. c. par exemple) de plasma de lapin (obtenu par le procédé à la paraffine), on constate que le mélange se coagule très rapidement. — La coagulation se fait encore normalement, mais avec notablement moins de rapidité, si les 2/10 de c. c. de plasma sont ajoutés à 1 c. c. de sérum de cobaye neuf, préalablement chauffé à 58°5. Cette lenteur de la prise en caillot, dans le second cas, est due à ce que le plasma de lapin, avec le fibrin-ferment qu'il contient, s'est dilué dans un volume assez considérable de liquide inactif. Au contraire, lorsque le sérum neuf de cobaye n'a pas été chauffé, le plasma introduit subit l'influence de deux fibrin-ferments dont les effets s'additionnent, celui du plasma lui-même, celui que renferme le sérum frais de cobaye. En d'autres termes, le ferment de ce dernier sérum contribue puissamment à la coagulation rapide du plasma de lapin.

Recevons maintenant un peu de plasma de lapin (2/10 de c. c.) dans deux tubes, l'un qui contient 1 c. c. de sérum, non chauffé, de cobaye *traité* par des injections de *plasma* de lapin ; l'autre, qui renferme 1 c. c. du même sérum, mais qui a été chauffé pendant 3/4 d'heure à 58°5. Préparons encore deux tubes témoins, semblables respectivement aux deux premiers, sauf qu'ils renferment, au lieu de sérum de cobaye traité, du sérum soit frais, soit préalablement chauffé, de cobaye *neuf*. Dans ces quatre tubes, les 2/10 de c. c. de plasma sont introduits au même moment.

La coagulation s'effectue très rapidement, au bout de 7 à 8 minutes, dans le tube contenant le sérum de cobaye neuf, non chauffé; elle apparaît plus lentement, au bout de 3/4 d'heure environ, dans celui qui renferme le sérum neuf chauffé.

Le mélange de plasma et de sérum chauffé de cobaye traité reste indéfiniment liquide. Ceci s'explique très bien, on l'a

vu, par la neutralisation du fibrin-ferment propre au plasma.

Quant au mélange de plasma et de sérum, frais et non chauffé, de cobaye traité, il reste très longtemps liquide; cependant la coagulation finit par s'y produire, partielle d'abord, plus complète ultérieurement. Après 2 à 4 heures, on trouve dans le tube un ou plusieurs grumeaux gélatineux, visqueux, baignant dans le liquide; plus tard, la coagulation s'étend davantage.

On ne peut guère attribuer ce retard à l'absence de fibrin-ferment : en effet, le liquide renferme, sinon du ferment de lapin (celui-ci a été neutralisé), au moins du ferment de cobaye. Il faut donc admettre que le sérum actif est capable d'altérer le fibrinogène de lapin et de diminuer son aptitude à la coagulation.

On constate, à ce point de vue, que le sérum de cobaye traité (surtout quand il n'a pas été chauffé) donne lieu, lorsqu'on y introduit du plasma de lapin, à un trouble qui bientôt se condense en flocons. Ce précipité représente très vraisemblablement du fibrinogène, car le sérum de cobaye traité, qui fait apparaître des flocons dans le plasma de lapin, ne précipite pas le sérum de cet animal, ou tout au moins n'y fait naître qu'une opalescence très légère, à peine perceptible, qui ne se condense pas en flocons [1].

Néanmoins cette action sur le fibrinogène, que M. Camus a déjà constatée, n'a qu'une intensité minime et n'entre que pour une faible part dans le pouvoir anticoagulant total d'un sérum actif. Elle suffit à retarder la coagulation, mais non à l'empêcher, lorsque le liquide renferme du fibrin-ferment intact. Ceci est vrai même quand le sérum actif est mêlé à une quantité faible de plasma. Par exemple, si l'on reçoit dans 6/10 de c. c. de sérum, *non chauffé*, de cobaye traité, 2 gouttes seulement de plasma de lapin, la coagulation est lente, reste longtemps partielle, mais finit néanmoins par devenir évidente. Corrélativement, un mélange, en doses comparables, de plasma et de sérum actif *préalablement chauffé* (mélange qui, conservé sans addition ultérieure, reste indéfiniment liquide) se coagule, bien qu'avec un retard très net, lorsqu'on y ajoute une dose suffisante de sérum frais

1. Rappelons que le sérum de cobaye traité par le sang (ou le sérum) de lapin, fait à cet égard exception à la règle générale, ainsi que l'un de nous l'a montré (ces *Annales*, 1899). Très généralement, en effet, le sérum d'un animal d'espèce A, injecté de sérum d'espèce B, précipite ce sérum B. Pour l'influence de la chaleur sur les propriétés précipitantes de pareils sérums, voir : « Le mécanisme de l'agglutination, ces *Annales*, 1899.

de lapin. De ce dernier fait, on conclut nécessairement que le sérum actif doit ses propriétés, en toute première ligne, à l'influence qu'il exerce sur le fibrin-ferment du lapin.

Ajoutons, pour terminer, que la propriété de modifier le fibrinogène, constatable dans le sérum de cobayes injectés de plasma, nous a paru très faible dans le sérum de cobayes qui avaient été traités, non par le plasma, mais par le sérum de lapin.

CONCLUSIONS

1° Le plasma d'oiseau (oie, poule), très pauvre en fibrin-ferment, très peu coagulable spontanément, et dont la préparation, ainsi que l'a montré M. Delezenne, ne comporte pas grandes difficultés, peut servir commodément comme réactif du fibrin-ferment contenu dans les sérums de diverses espèces animales.

2° Le plasma de lapin, qu'on peut obtenir en se servant de tubes paraffinés, contient du fibrin-ferment. Dans la coagulation de ce plasma (ou du sang), un phénomène de contact, de nature purement physique, intervient. Tandis que le plasma se conserve assez longtemps liquide dans un tube paraffiné, il se coagule rapidement, même en l'absence de cellules, au contact du verre.

3° Les animaux d'espèce A, injectés de plasma ou de sérum d'espèce différente B, fournissent un sérum qui neutralise le fibrin-ferment (du sang ou du sérum) de l'espèce B. En outre (surtout quand il s'agit d'animaux injectés de plasma), ces sérums précipitent le plasma d'espèce B; ils en modifient le fibrinogène qui devient moins apte à la coagulation. C'est à l'action sur le fibrin-ferment que le sérum actif doit, pour la plus grande part, son pouvoir anticoagulant.

4° Cette action présente, sinon d'une manière absolue, au moins très nettement, le caractère de la spécificité. Il en résulte que les fibrin-ferments fournis par les diverses espèces animales, bien que doués de propriétés fort semblables (pouvant tous provoquer la coagulation d'un même fibrinogène), ne sont pas complètement identiques. Cette conclusion rappelle celle qui a été émise antérieurement (ces *Annales*, 1900) au sujet des alexines.

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DE LA FIÈVRE TYPHOIDE ET DE SON BACILLE[1]

TROISIÈME PARTIE[2]

Procédé nouveau pour isoler le bacille typhique des eaux.

PAR L. REMY

Dr ès sciences et en médecine.
Chef des travaux à la section de bactériologie annexée au
Laboratoire d'analyses de l'État, à Liége.

Dans un précédent mémoire sur l'antagonisme entre les bacilles typhique et coli[3], nous avons établi que ces deux organismes peuvent vivre en commun sans que la multiplication du bacille typhique soit enrayée par la présence du coli. Cette notion nouvelle, en éclairant quelques points encore obscurs du rôle de l'eau dans la propagation de la fièvre typhoïde, rendra, espérons-le, un peu de vitalité à l'analyse bactériologique des eaux, que domine encore la conception de l'écrasement du bacille typhique par le bacille coli.

D'autre part, les théories lyonnaises, en élevant le bacille coli à la hauteur d'agent typhogène, attribuèrent un rôle important à sa présence dans les eaux. Laruelle, Fränkel, Charrin, Chantemesse, Malvoz, Girode, etc., etc., en démontrèrent d'ailleurs la virulence.

Lorsque les recherches d'Elsner[4] et Brieger[5] rétablirent la

1. Nos recherches ont été faites au laboratoire de la clinique médicale, professeur M. Masius, et à notre laboratoire.

Qu'il nous soit donc permis de réitérer à M. le professeur Masius l'hommage de nos sentiments de profonde reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle il nous a ouvert les portes de son laboratoire.

Nous renouvelons aussi à notre confrère et ami, M. le Dr Beco (chef des travaux au laboratoire de la clinique médicale), l'expression de nos vifs remerciements pour les nombreux services qu'il nous a rendus pendant l'élaboration de notre travail.

2. Ces *Annales*, tome XIV, nos 8 et 11, 1900.

3. Ces *Annales*, tome XIV, no 11.

4. *Centralbl. f. Bakt. und Paras*, 1895.

5. *Deutsche medic. Wochens*, 1885, no 5.

spécificité du bacille d'Eberth, la réaction ne tarda pas à se produire, et il semble qu'à l'heure actuelle nous assistions à la réhabilitation du bacille coli, que l'on considère un peu trop comme une bactérie bénigne dont l'existence dans les eaux n'a pas d'importance. On ne recherche donc plus que peu ou point le bacille typhique dans les eaux, puisqu'on admet qu'il y est écrasé par le bacille coli, et on considère ce dernier comme un hôte peu dangereux dont la signification est nulle ou peu s'en faut. Il en résulte que nous ne possédons plus, comme base d'appréciation de la valeur bactériologique d'une eau, que le nombre des colonies, et que par conséquent nous nous rapprochons insensiblement de l'enfance de l'analyse microbiologique des eaux, alors que celle-ci devrait être considérée comme l'auxiliaire le plus puissant de l'hygiène prophylactique de la fièvre typhoïde.

La tolérance que les bactériologistes montrent à l'égard des eaux contenant le bacille coli peut avoir des conséquences désastreuses au point de vue de la propagation de la dothiénentérie, car le bacille coli nous paraît être un réactif excellent nous révélant l'existence sinon probable, tout au moins possible du bacille d'Eberth dans les eaux d'alimentation. Il est certain, d'ailleurs, que celui-ci passe souvent inaperçu. En effet, puisque le bacille typhique est bien l'agent de la fièvre typhoïde, pas de dothiénentérie sans le bacille d'Eberth, et alors celui-ci doit fatalement exister dans l'eau des puits qui donnent le typhus. Cependant Weeney[1], Wernicke et Busenius[2], Sedgwick[3], Gibert[4], Pottien[5], Robertson[6], van de Velde[7] n'ont jamais retiré que le bacille coli des eaux suspectes d'avoir donné la fièvre typhoïde.

Une autre raison qui milite en faveur de l'existence du bacille typhique dans beaucoup d'eaux est la constatation faite par

1. Démonstration ofthe typhique bacille in suspect water by Pariettis Methode, *Centr. für Bakt.* B., XVIII, 1895.

2. Ein Beitrag zür Kenntnis des typhus épidemie, *Centr. f. Bact.*, B. XIV, 1866.

3. Of recent épidemies of typh. fever in the cities of Towel and Lawrence, *Centralb. f. Bakt.*, B. XVIII, 1895.

4. Les causes de la fièvre typhoïde au Havre, *Ann. microgr.*, n° 6, 1896.

5. Die Typhus épid. des Iahres 1897 in Gräfentonna, *Centralbl. f. Bakt*, XXIV Band, 1898.

6. Some point in the étiology of typhoïd fever, *The Lancet*, avril 1898.

7. Valeur de l'agglutination dans le sero-diagnostic de Vidal et dans l'identification des bacilles éberthiformes, *Centralb. f. Bakter.*, B. XXIII, 1898, p. 481.

Chantemesse de l'apparition de la fièvre typhoïde dans les quartiers où a lieu momentanément le mélange d'eau de Seine à l'eau de la distribution. Le même fait a été observé pour Hambourg et Altona. Il est vrai que les partisans des théories lyonnaises attribuaient dans ce cas l'infection aux bacilles coli que les eaux de rivière véhiculent en abondance, mais cette explication est en opposition avec les idées actuelles, qui n'acceptent plus la contagion en dehors de la présence de l'agent spécifique. Il faut donc bien admettre que celui-ci existe dans les eaux qui donnent la dothiénentérie, mais que sa recherche est tellement difficile qu'il échappe aux analystes.

D'autre part, nous devons bien reconnaître que si les distributions d'eaux d'alimentation ont fait considérablement diminuer le nombre des cas de fièvre typhoïde, elles ne les ont pas complètement supprimés.

Malvoz[1] attribue les cas de dothiénentérie que l'on observe encore sporadiquement dans les villes abondamment pourvues d'eau potable à l'auto-infection par le coli intestinal qui, sous l'influence de causes inconnues, serait devenu agent typhogène. Sans prétendre vouloir expliquer tous ces cas sporadiques par l'ingestion d'eau contaminée, nous croyons cependant qu'il est plus logique de substituer aux circonstances imprécises et vagues, qui président à la transformation du bacille coli intestinal en bacille typhique, la notion nette et précise de la contagion par le germe spécifique qui, à certains moments, se trouverait dans l'eau d'alimentation que l'on distribue aux habitants. Ce qui nous confirme dans cette opinion, c'est que nous avons retiré le bacille d'Eberth d'une eau d'alimentation qui depuis plusieurs années avait toujours été reconnue pure à l'analyse bactériologique. Jamais le bacille coli n'y avait été rencontré. La présence du bacille typhique coïncidait avec l'augmentation du nombre général des colonies et avec la présence du bacille coli.

Les considérations qui précèdent sont de nature à emporter la conviction que le bacille typhique doit fréquemment exister dans les eaux en compagnie des bactéries saprophytes et surtout du bacille coli qui peuplent habituellement celles-ci.

Comment donc alors peut-on l'isoler dans ce cas?

Plusieurs procédés ont été signalés dans ce but. Tous sont

1. *Mémoires cour. et autres de l'Ac. roy. de méde. de Belg.*, p. 87.

basés sur la notion de l'écrasement du bacille typhique par les bactéries saprophytes. Leurs auteurs se sont ingéniés à trouver une méthode permettant au contraire d'étouffer ces dernières, tout en laissant le bacille typhique se développer librement. Pour satisfaire à ces deux conditions, Rodet et Roux[1] se sont adressés à la chaleur (température 45°,5), Vincent[1] à l'action combinée de l'acide phénique et de la chaleur (température 42°), Péré[1] à l'acide phénique 1/1000 (température 32° à 36°), Parietti[1] à l'action commune de l'acide phénique 0,5 à 1.5/000 et de l'acide chlorydrique 0,4 à 1,25/000.

Ces procédés peuvent donner des résultats heureux quand les bacilles typhiques sont très vigoureux; les expériences sur lesquelles se sont appuyés leurs auteurs pour les combiner ont d'ailleurs été instituées avec des organismes de laboratoire qui d'habitude sont doués d'une vitalité particulière, et par conséquent d'une résistance exceptionnelle vis-à-vis des causes entravant leur développement. Les bacilles typhiques des eaux, au contraire, sont adaptés à des conditions d'existence autres que celles où nous les forçons à vivre dans nos laboratoires, ils sont habitués à une température peu élevée : il en résulte que pour eux, une température de 37° peut être dysgénésique. C'est ainsi que le bacille typhique de la selle 20, après avoir vécu quelque temps à la température de la chambre (25-30°), ne cultivait plus bien à la température de 37°, mais troublait abondamment le bouillon entre 25° et 30°. Cette constatation nous permet de suspecter la valeur des procédés que nous venons d'énumérer. Il importait donc de rechercher si on pouvait leur substituer une méthode mieux en rapport avec les données que nous avons acquises au cours de nos études antérieures sur le bacille typhique.

Dans ce but, nous avons fait vivre en mélange le bacille typhique de Liége et le bacille coli Gand, que nous avons choisis parce qu'ils ne perdent pas leurs propriétés spécifiques, et que par conséquent il est toujours aisé de les distinguer, alors même qu'ils sont affaiblis par la vie commune. Nous avons opéré comme suit :

Le 2 avril, à 10 c. c. de bouillon peptonisé, nous avons

1. *Précis d'analyse microbiologique des eaux*, par le Dr G. Roux, page 213.

ajouté une anse[1] d'une culture de bacille typhique Liége en bouillon, âgée de 24 heures, et la même anse d'une culture de B. coli dans les mêmes conditions. Le mélange a été placé à la température de 25°-30°. Une série d'ensemencements nous a permis d'élucider les deux points suivants, qui sont d'une importance capitale au point de vue pratique de la recherche du bacille typhique dans les eaux :

1° Dans des conditions différentes de vigueur et d'affaiblissement, le bacille typhique se multiplie-t-il en présence du bacille coli ?

2° Quand les organismes sont affaiblis, quelle est l'influence sur leur développement (plaques de gélatine) et sur l'enrichissement des cultures en bacilles typhiques, d'un passage :

a) En bouillon phéniqué 1/1000, température 25-30. (Procédé Péré) ;

b) En bouillon phéniqué 0,5/1000, acide H^2SO^4 0,5/1000, température 25-30°.

Avant de résumer les résultats de nos expériences, nous croyons utile de donner quelques renseignements qui nous permettront d'être plus bref dans l'exposé que nous allons en faire :

1° Nous avons distingué les organismes typhique ou coli du mélange par leurs propriétés spécifiques : agglutination, indol, gaz en gélatine lactosée ;

2° Lors de chaque ensemencement, nous avons compté les colonies typhiques et coliennes apparues sur plaques; il est évident que les nombres que nous donnons ne sont qu'approximatifs; au lieu de repiquer chaque fois la totalité des colonies de la plaque et de les déterminer ensuite, nous nous sommes contenté d'en étudier 10 de chacune des deux variétés, et nous en avons conclu à l'identité des organismes constituant les autres colonies de la même variété ;

3° L'ensemencement du mélange a toujours été pratiqué comme suit :

1re Dilution : une anse du mélange dans 10 c. c. d'eau stérilisée ;

2e Dilution, une anse de la 1re dilution dans 10 c. c. d'eau stérilisée.

1. Nous avons employé une anse double afin que nos résultats fussent comparables autant que possible.

De cette seconde dilution, 2 anses ont été ensemencées dans la gélatine différentielle habituelle, c'est-à-dire contenant 0,25/1000 d'acide phénique : c'est la plaque II. 3 anses ont été introduites dans la gélatine différentielle contenant 0,5/1000 d'acide phénique : c'est la plaque III.

Résultats. — Les résultats obtenus pendant les 10 premiers jours de la vie commune ne présentent guère d'intérêt au point de vue de la question qui nous occupe particulièrement, parce que pendant cette période de temps, les organismes ayant conservé leur énergie vitale, nous nous trouvions dans les conditions où s'étaient placés Rodet et Roux. Vincent, Parietti, Péré pour combiner leur procédé d'isolement du bacille typhique. Nous les consignons dans le tableau suivant :

DATE de l'ensemencement	Plaque II 0,25 0/00 ac. phén.		Plaque III 0,5 0/00 ac. phén.	
	Nombre de colonies coliennes.	Nombre de colonies typhiques	Nombre de colonies coliennes.	Nombre de colonies typhiques.
3 avril	17	13	25	20
4 avril	70	60	100	90
6 avril	115	90	200	150
9 avril	130	110	195	170
12 avril	140	120	205	180
14 avril	75	35	110	40

Cette première série d'expériences nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1° Le bacille typhique vigoureux peut se multiplier abondamment en présence du bacille coli. Le nombre des colonies augmente en effet jusqu'au 10e jour à partir de la préparation du mélange. Dès le 11e jour la quantité des colonies diminue considérablement pour chacun des deux organismes : toutefois la diminution frappe plus fortement le bacille typhique que le bacille coli;

2° Les colonies typhiques apparaissent sur plaques le 2e ou le 3e jour qui suit l'ensemencement;

3° L'acide phénique à la dose de 0,5 au lieu de 0,25/1000,

dans la gélatine différentielle, retarde l'apparition des colonies typhiques.

Puisque à partir du 10e jour de la vie commune, le bacille d'Eberth commençait à s'affaiblir, nous nous trouvions dans de bonnes conditions pour étudier comment il se comportait alors vis-à-vis des antiseptiques, et pour rechercher s'il existe un procédé permettant d'enrichir une culture en bacille d'Eberth aux dépens du bacille coli.

Afin d'arriver à la solution de ces deux questions, nous avons pratiqué une nouvelle série d'ensemencements comme suit :

I. — Procédé direct.

Ensemencement direct dans la gélatine différentielle.

Plaque II, 0,25/1000 d'acide phénique [1].

Plaque III, 0,5/1000 d'acide phénique [2].

II. — Procédés indirects.

A.) Procédé Péré. — 1er *Passage*. 1 anse du tube de mélange dans 10 c. c. de bouillon neutre phéniqué 1/1000.

2e *Passage*. Après 24 heures de séjour à la température de 25-30°, 1 anse du 1er passage dans 10 c. c. bouillon neutre phéniqué 1/1000.

3e *Passage*. Dans les mêmes conditions que le second.

B.) Procédés Remy. — Les 3 passages ont été effectués dans du bouillon acide, 0,5/1000 d'H^2SO^4, phéniqué 0,5/1000 acide carbolique, et les tubes placés à la température de 25-30°.

Après chacun des passages des procédés Péré ou Remy, des plaques de gélatine différentielle ont été faites comme pour le procédé direct.

Nous groupons dans le tableau suivant les expériences qui présentent le plus d'intérêt au point de vue de la question qui nous occupe actuellement.

Avant de résumer les résultats que nous avons obtenus, nous croyons utile d'attirer l'attention sur certains points importants qui faciliteront l'interprétation de ce tableau :

1° Les chiffres qui y sont inscrits n'ont qu'une valeur relative, car le nombre d'anses a varié lors de chaque ensemencement ;

1-2. Pour les dilutions, voir ensemencements, I à VI.

DATE de l'ensemencement.	Nombre d'anses prélevées pour 1re dilution ou pour procédé Péré ou Remy	PROCÉDÉ DIRECT				PROCÉDÉ PÉRÉ				PROCÉDÉ REMY			
		Plaque II.		Plaque III.		Plaque II.		Plaque III.		Plaque II		Plaque III.	
		Nombre de colonies		Nombre de colonies		Nombre de colonies		Nombre de colonies		Nombre de colonies		Nombre de colonies	
		coliennes	typhiques	coliennes	typhiques	coliennes	typhiques	coliennes	typhiques	coliennes	typhiques	coliennes	typhiques
18 avril.	1 anse.	65	25	80	30	60	21	92	30	90	35	110	40
27 avril.	4 anses.	165	25	200	10	60	2	75	0	60	4	75	1
18 mai.	10 anses.	150	30	200	16	8	0	7	0	123	2	160	0
26 mai.	15 anses.	157	25	17	17	6	0	3	0	90	0	80	0

2°) Pour établir la comparaison entre les résultats fournis par les ensemencements direct et indirect, il faut se rappeler que nous avons opéré comme suit :

Procédé direct. — 1re dilution 1, 4, 10 ou 15 anses du tube de mélange dans 10 c. c. d'eau stérilisée : 2e dilution, 1 anse de la 1re dilution dans 10 c. c. d'eau stérilisée : plaques II et III respectivement avec 2 et 3 anses de la 2e dilution, ainsi que 0,25 et 0,5/1000 d'acide phénique.

Procédés indirects. — 1re dilution 1, 4, 10 ou 15 anses du tube de mélange dans 10 c. c. de bouillon Péré ou Remy. 1er passage.

2e dilution, après 24 heures de séjour à la température de 25-30, 1 anse de 1re dilution dans 10 c. c. eau stérilisée.

3e dilution, 1 anse de la 2e dilution dans 10 c. c. d'eau stérilisée.

Plaques II et III, respectivement 2 et 3 anses de la 3e dilution. Pour les procédés indirects, il y a donc une dilution en plus. Si nous tenons compte que 1 c. c. contient à peu près 30 anses, les 10 c. c. de la 3e dilution en renferment 300.

Nous devons donc multiplier approximativement par 300 les nombres obtenus par les ensemencements indirects, pour les comparer à ceux que fournit l'ensemencement direct.

Nous pouvons maintenant résumer rapidement les constatations que nous avons faites au cours de ces expériences :

1° Il n'existe aucun procédé permettant l'enrichissement d'une culture en bacilles typhiques aux dépens du bacille coli. Au contraire les différentes méthodes favorisent d'autant plus la prédominance du bacille coli que le nombre de passages en milieux phéniqués est plus considérable : c'est pour ce motif que les résultats fournis par les 2e et 3e passages des procédés Péré et Remy ne figurent pas au tableau précédent ;

2° Qu'il s'agisse d'ensemencement direct ou indirect, les colonies de bacille d'Eberth apparaissent d'autant plus tardivement sur plaques que les organismes sont plus affaiblis ; c'est ainsi que le 17 mai elles ne sont guère distinctes que le 7e jour après l'ensemencement, tandis que le 18 avril, on pouvait les reconnaître 3 jours après la préparation des plaques ;

3° Le bouillon phénolisé à 1/1000 (Péré) entrave la multiplication du bacille d'Eberth affaibli après 46 jours de vie com-

mune (18 mai), toutefois il ralentit considérablement aussi celle du bacille coli ;

4° Le bouillon additionné de 0,5/1000 des acides phénique et sulfurique ralentit la multiplication du bacille d'Eberth affaibli par la vie en commun avec le bacille coli, mais il ne l'enraye pas même après 46 jours d'existence dans le mélange ;

5° Lorsque les bacilles typhiques sont affaiblis, la gélatine différentielle contenant 0,5 au lieu de 0,25/1000 d'acide phénique empêche le développement des bacilles d'Eberth qui ont subi un passage dans les bouillons Péré ou Remy.

Les résultats qui précèdent nous autorisent à poser les deux conclusions suivantes :

1° L'ensemencement direct est préférable à l'ensemencement indirect pour isoler le bacille typhique en présence du bacille coli : il lui est surtout supérieur lorsque les organismes sont affaiblis ;

2° Des différents procédés indirects, c'est celui que nous avons signalé qui convient le mieux, pour isoler le bacille typhique en présence du bacille coli, tant lorsque les organismes sont vigoureux que lorsqu'ils sont affaiblis.

La méthode que nous avons combinée permettant la multiplication du bacille typhique en présence du bacille coli, il importait, avant de la recommander à l'attention des bactériologistes, de nous assurer si elle enrayait la prolifération des organismes liquéfiants qui sont représentés par un grand nombre d'espèces dans la flore habituelle des eaux, et qui souvent compliquent singulièrement la question de l'isolement du bacille typhique.

Nous avons entrepris de nombreuses expériences dans ce but : nous ne les exposerons pas en détail, parce que nous craindrions d'abuser de la bienveillante hospitalité qu'ont bien voulu nous accorder les *Annales*. La description du procédé opératoire serait également superflue, puisqu'en opérant toujours dans les mêmes conditions nous avons obtenu des résultats qui ne concordaient pas entre eux.

Le contraire nous aurait d'ailleurs étonné ; on sait en effet, à l'heure actuelle, que l'action d'un même antiseptique varie avec l'espèce microbienne, et que pour une même espèce elle dépend du nombre de ses représentants, de leur énergie vitale, du

milieu où ils ont vécu et peut-être aussi des variétés de cette espèce. Ce sont là autant d'éléments inconnus de l'analyste au moment où il pratique l'expertise de l'échantillon d'eau qui lui a été adressé. On conçoit donc aisément que l'élimination des bactéries liquéfiantes est un but vers lequel le bactériologiste doit diriger ses efforts sans jamais pouvoir l'atteindre. C'est dire que nos expériences ne nous permettent pas de poser des conclusions formelles : toutefois elles nous autorisent à tirer certains enseignements, qui ont une importance capitale au point de vue de l'isolement du bacille typhique dans les eaux :

1° La gélatine différentielle, additionnée de 0,25 et surtout de 0,50/1000 d'acide phénique, retarde considérablement l'apparition des colonies liquéfiantes ;

2° Un passage en bouillon phéniqué 0,5/1000, acide 0,5/1000 H^2SO^4, exposé à la température de 25-30° pendant 22-24 heures, suffit pour enrayer le développement de la plupart des germes liquéfiants. Toutefois, ceux-ci ne sont pas tués, car si l'on pratique un second passage dans les mêmes conditions, les colonies liquéfiantes reparaissent plus nombreuses que sur les plaques de gélatine ensemencées directement avec l'échantillon. D'ailleurs, sur les plaques de gélatine faites après le 1er passage, il n'est pas rare de repiquer des colonies non liquéfiantes qui, ensemencées par piqûre dans des tubes de gélatine, liquéfient alors celle-ci ;

3° Si l'on augmente les doses d'acides phénique ou sulfurique, on parvient à se débarrasser complètement des microbes liquéfiants ; mais alors on se trouve généralement en présence d'une culture pure de bacille coli.

Les considérations qui précèdent nous ont permis de combiner un procédé d'isolement du bacille typhique en présence des bactéries nombreuses qui souillent habituellement les eaux. Nous le décrirons ici sommairement, afin de pouvoir résumer ensuite succinctement les applications que nous en avons faites pour la recherche du bacille d'Éberth dans les eaux.

Avec l'eau à analyser nous pratiquons deux ensemencements distincts en gélatine différentielle[1] : d'abord un ensemencement direct, ensuite un ensemencement indirect.

1. D'habitude nous pratiquons aussi un ensemencement direct en gélatine ordinaire.

A. *Ensemencement direct.* — A un tube de gélatine différentielle habituelle, c'est-à-dire acide (0,5/1000 H^2SO^4), lactosée (3/100), phéniquée (0,25/1000), nous ajoutons 1/20, 1/10, 1/2 c. c. d'eau suivant l'origine de celle-ci; c'est la plaque I.

La plaque II s'obtient avec la même gélatine, mais contenant 0,5/1000 d'acide phénique; en outre elle reçoit 1/10, 2/10, 1 c. c. d'eau suivant l'origine de celle-ci. Parfois nous faisons plus de deux plaques, mais toujours les dilutions les plus fortes sont placées dans les tubes de gélatine qui contiennent les doses les plus faibles d'acide phénique.

Puisque l'ensemencement direct donne de meilleurs résultats que l'ensemencement indirect, il serait utile de pouvoir opérer avec des plaques plus grandes que celles dont on se sert d'habitude, et de prélever non pas 10 c. c. de gélatine, mais bien 25 ou 50 c. c. auxquels on incorporerait alors 2-5 c. c. ou même davantage de l'eau à analyser.

B. *Ensemencement indirect.* — 10, 20, 50 c. c., suivant l'origine de l'eau à analyser, sont introduits dans un matras contenant du bouillon acidifié par H^2SO^4 et phéniqué, de telle sorte que le mélange de bouillon et d'eau renferme 0,5/1000 des acides sulfurique et carbolique. Après un séjour de 22-24 heures à la température de 25-30°, on fait des plaques de gélatine différentielle additionnée de 0,25 et 0,50/1000 d'acide phénique, avec des dilutions variables suivant le trouble du mélange. Les tubes de gélatine les moins phéniqués reçoivent les dilutions les plus fortes.

Les plaques sont alors abandonnées à la température de 20°. Avant d'aborder l'étude des colonies apparues sur celles-ci, rappelons que l'ensemencement direct est préférable aux procédés indirects pour l'isolement du bacille typhique, et que, pour chacune des deux méthodes directe ou indirecte, c'est la plaque contenant 0,25/000 d'acide phénique qui nous permet d'atteindre le plus aisément le but.

Dès le 2e-3e jour, on passe à l'examen[1] des colonies. On marque au crayon bleu celles qui sont profondes[2], bleutées ou blanc bleuté. C'est parmi celles-ci que l'on trouvera les bacilles typhiques authentiques, les bacilles d'Éberth non agglutinés, les

1. Voir ces *Annales*, 25 août 1900, p. 563.
2. Le bacille typhique ne donne qu'exceptionnellement des colonies étalées quand il se trouve en présence du bacille coli. Ces *Annales*, page 567.

bacilles coli affaiblis et d'autres organismes de confusion. S'il y a peu de ces colonies, elles seront repiquées[1] en bouillon préalablement chauffé à la température de 35-37°, afin d'obtenir rapidement la liquéfaction du cube de gélatine transporté avec la colonie. Après agitation, ces tubes de bouillon seront placés à la température de 25-30°.

S'il y a beaucoup de colonies, l'observation des modifications qu'elles subissent en vieillissant permet d'en écarter un certain nombre.

Les colonies éberthiennes peuvent augmenter de volume, mais elles conservent leur aspect. Parmi les colonies bleutées, les unes prennent rapidement une teinte brunâtre (coli attaquant la lactose), les autres gardent leur aspect bleuté (coli privés de leurs propriétés). Ces quelques points de repère sont suffisants pour permettre aux bactériologistes qui s'occupent d'analyses d'eaux de s'orienter dans la recherche du bacille typhique. Il est d'ailleurs impossible de prévoir les différents aspects que peuvent présenter les colonies des nombreuses espèces qui peuplent habituellement les eaux, puisque ces aspects varient probablement, comme c'est le cas pour les bacilles typhique et coli, avec l'énergie vitale et l'origine des bactéries aquatiles. Une description plus étendue serait donc quand même encore schématique, et. fût-elle parfaite, elle ne donnerait encore, comparativement à l'observation personnelle que chacun peut en faire, qu'une idée bien incomplète de la différence qui existe entre les différentes espèces de colonies. Disons, d'ailleurs, que la distinction des colonies typhiques, non seulement d'avec les colonies coliennes, mais encore d'avec les colonies d'autres bactéries qui constituent la flore habituelle des eaux, est parfois difficile sinon impossible, et que, dans bien des cas, on ne parvient à tourner cette difficulté qu'en repiquant un grand nombre de colonies[2]. Enfin l'isolement du bacille typhique est parfois encore rendu plus difficultueux par l'apparition tardive de ses colonies.

Les cubes de gélatine contenant chacun une colonie sont déposés dans des tubes de bouillon portés à la température de 35-37°; dès qu'ils sont liquéfiés, on agite le tube et on le

1. Voir ces *Annales*, page 565.

2. Dans aucun autre cas, cependant, nous n'avons dû repiquer plus d'une trentaine de colonies pour atteindre le but.

place à la température de 25-30°. Les organismes qui s'y développent sont différenciés à l'aide des procédés que, dans les laboratoires, on emploie habituellement dans ce but[1]. Nous attirons particulièrement l'attention sur le fait que les bacilles typhiques des eaux donnent parfois un voile dans les cultures en tube de bouillon.

APPLICATIONS DU PROCÉDÉ A LA RECHERCHE DU BACILLE TYPHIQUE DANS LES EAUX

Le procédé que nous venons de résumer succinctement a permis de rechercher la solution des deux questions suivantes, que nous ont inspirées les résultats obtenus dans notre étude sur l'antagonisme entre le bacille typhique et le bacille coli[2] :

1° Dans les conditions naturelles de leur existence, le bacille typhique et le bacille coli peuvent-ils vivre côte à côte, et coexistent-ils fréquemment dans les puits ayant donné la fièvre typhoïde ?

2° Les bacilles typhique et coli, que la vie commune a privés de leurs propriétés, sont-ils des productions artificielles de laboratoire ou peut-on les rencontrer dans la nature ?

Avant d'exposer nos recherches personnelles, résumons rapidement ce que la littérature nous apprend sur ce sujet :

Le bacille d'Éberth, avec ses caractères distinctifs, a été isolé de l'eau par Remlinger et Schneider[3], Kübler et Neufeld[4], Nicolle et Spillmann[5].

Remlinger et Schneider, Nicolle et Spillmann ont isolé en même temps que le bacille typhique, dans les puits ayant donné la fièvre typhoïde, un bacille semblable à ce dernier, mais n'étant pas agglutiné par le sérum antityphique expérimental. De l'eau d'un puits ayant donné la dothiénentérie, Kister[6] également a retiré un bacille ressemblant au bacille typhique, mais qui n'était pas agglutiné.

1. Voir aussi à ce sujet ces *Annales*, 25 novembre 1900, page 722.
2. Ces *Annales*, 25 novembre 1900.
3. Contribution à l'étude du bacille typhique. Ces *Annales*, 1897.
4. Über ein Befund von typhusbacil. im Brunnenwasser, *Zeit. f. Hyg.*, B. 31, 1ste H.
5. Sur quelques cas de fièvre typhoïde d'origine hydr. certaine, *Comptes rendus de la Société de biologie*, xe série, tome VI, 1889, p. 154.
6. Typhusähnl. Bacil. aus typhus verdach. Brunnenwasser, *Centralb. f. Bakt.*, t. XXII.

D'autre part, Gilbert et Lion[1] ont retiré des selles un bacille coli peu mobile ne donnant ni gaz ni indol.

Les résultats auxquels nous ont conduit nos expériences sur l'antagonisme entre les bacilles typhique et coli sont donc confirmées par des travaux, rares il est vrai, dont fait mention la littérature. Nous pourrons ainsi résumer brièvement nos recherches, puisqu'elles appuient les observations faites par les auteurs que nous venons de citer.

RECHERCHE DU BACILLE D'ÉBERTH DANS LES EAUX DE RIVIÈRES

Après quelques tentatives infructueuses, nous sommes parvenus à retirer de l'eau de la Meuse et de la Vesdre :

1° Un bacille typhique authentique, agglutiné à 1/60,000 par le sérum antityphique expérimental;

2° Un bacille présentant les caractères culturaux et morphologiques du bacille d'Éberth, mais qui n'était que très faiblement agglutiné par le sérum antityphique expérimental. L'injection de ce bacille au cobaye nous a fourni un sérum agglutinant à 1/120 le bacille typhique de Liége. Ce bacille est donc un bacille typhique authentique;

3° Plusieurs bacilles mobiles présentant les caractères du bacille d'Éberth, mais qui étaient absolument insensibles aux agglutinines du sérum antityphique expérimental. Tous ces bacilles ont été injectés aux cobayes. Un seul d'entre eux a provoqué dans le sérum l'apparition de propriétés agglutinantes vis-à-vis du bacille typhique de Liége, qui était agglutiné à 1/40. Nous l'avons rangé dans le groupe des typhiques. Les autres bacilles injectés ont laissé le sérum des cobayes absolument inactif vis-à-vis du bacille typhique de Liége. Nous les avons classés dans la catégorie des organismes indéterminables par les procédés pratiques et rapides dont on dispose actuellement dans les laboratoires.

RECHERCHE DU BACILLE D'ÉBERTH DANS LES EAUX D'ALIMENTATION

Les organismes indéterminables se rencontrent assez fréquemment dans les eaux de boisson.

1. Contribution à l'étude des bactéries intestinales. *Comptes rendus de la Société de biologie*, t. X, 1893.

Dans les eaux qui avaient donné la fièvre typhoïde, nous retrouvons parfois le bacille typhique authentique, parfois aussi nous ne sommes pas parvenu (2 fois sur 6 cas) à en isoler un organisme que nous puissions légitimement considérer comme bacille d'Éberth.

Les résultats auxquels nous a conduit la recherche du bacille d'Éberth dans les eaux confirment les faits que nous avons établis dans notre étude sur l'antagonisme entre le bacille typhique et le bacille coli[1]; ils montrent :

1° Que les bacilles d'Éberth, privés de leur sensibilité vis-à-vis des agglutinines, ne sont pas des productions artificielles de laboratoire, mais qu'on peut les rencontrer dans les conditions habituelles de leur existence;

2° Que le meilleur moyen de déterminer la nature typhique d'un organisme possédant les caractères morphologiques et culturaux du bacille d'Éberth est l'injection au cobaye[2]. Cette opération est inutile si cet organisme est agglutiné à un titre élevé par le sérum antityphique expérimental.

1. Ces *Annales*, tome XIV, n° 11, 1900.

2. Ce procédé de diagnose a été proposé au Congrès tenu à Paris en 1900, par Fodor (*Presse médicale*, 1er septembre 1900), mais nos recherches sont antérieures à cette date; nos trois mémoires réunis ont, en effet, été envoyés au concours pour la collation des bourses de voyage de Belgique, en mai 1900.

RECHERCHES SUR LA VACCINE EXPÉRIMENTALE

PAR

LE Dr A. CALMETTE, ET C. GUÉRIN,

Directeur de l'Institut Pasteur de Lille

Médecin vétérinaire, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille.

La réceptivité du lapin pour la vaccine a été signalée dès 1889 par Gailleton. Bard et Leclerc montrèrent ensuite (*Gazette hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 1891, p. 81) que cet animal peut parfaitement être employé comme vaccinifère, et que la lymphe qu'il fournit, inoculée à la génisse, et de celle-ci à l'enfant, reproduit l'éruption vaccinale avec tous ses caractères. Ces savants obtenaient leurs pustules chez le lapin en scarifiant la peau du dos préalablement rasée.

Nous avons repris leurs expériences dans le but de rechercher s'il ne serait pas possible de contrôler avec précision la virulence des vaccins de diverses origines et d'âges différents en utilisant le lapin. Nous avons été conduits en même temps à étudier l'évolution de la vaccine chez cet animal et à entreprendre des essais multiples de culture *in vivo* de l'agent virulent encore inconnu du vaccin. Ces essais ne nous ont donné jusqu'à présent que des résultats négatifs, disons-le tout de suite; mais ils nous ont permis de constater certains faits intéressants que nous croyons utile de publier.

I

ÉVOLUTION DE L'ÉRUPTION VACCINALE CHEZ LE LAPIN

Lorsqu'on pratique l'inoculation vaccinale chez le lapin au moyen de scarifications superficielles intéressant plus ou moins profondément le derme, on obtient rarement des pustules ombiliquées caractéristiques. Le plus souvent on observe, le troisième et le quatrième jour, la formation d'une zone rouge autour de la strie, presque sans gonflement des tissus sous-jacents, et cette

zone ne tarde pas à se couvrir d'une croûte sèche qui tombe vers le septième jour. Il semble qu'on ait affaire à des pustules avortées, comme on en observe chez les génisses après l'inoculation de vaccin dégénéré.

Il est extrêmement rare qu'on obtienne ainsi des boutons franchement ombiliqués, et, lorsqu'on inocule le même vaccin à plusieurs lapins, on trouve que la réceptivité de ces animaux st très variable. Beaucoup d'entre eux ne donnent pas la moindre ruption.

Nous avons d'abord pensé que, si l'évolution vaccinale présentait tant de variabilité chez le lapin, il fallait peut-être en chercher la raison dans la difficulté d'immobiliser ces animaux et de les empêcher de souiller le champ opératoire. Nous avons recouvert celui-ci avec des pansements ouatés et du collodion, et nous avons placé nos animaux à l'obscurité, à des températures différentes. Nous avons constaté ainsi que l'éruption se faisait le mieux chez les lapins dont le champ vaccinal était à découvert, et que nous maintenions à une température moyenne de 18 à 20°.

L'obscurité n'avait aucune influence sur l'évolution des pustules. Le mode d'insertion en avait bien davantage : toutes les fois que le derme était entamé un peu profondément pendant la scarification et qu'il y avait effusion de sang même légère, non seulement l'insertion vaccinale faite à cet endroit ne produisait aucune pustule, mais il ne s'en produisait pas non plus sur le reste du champ.

Au contraire, si nous nous contentions de badigeonner avec de la pulpe vaccinale la peau fraîchement rasée, sans faire d'autres lésions épidermiques que celles très superficielles que produit le feu du rasoir, nous obtenions, avec une régularité parfaite, des éruptions confluentes tout à fait caractéristiques. Après 48 heures, on observe en pareil cas une congestion intense du derme, dont la coloration rouge vif tranche sur les parties voisines restées blanches. Cette réaction locale est surtout apparente chez les animaux de couleur claire ou albinos.

Le troisième jour, l'éruption est à maturité complète. La plupart des pustules s'ombiliquent nettement, surtout sur les bords des plaques rouges. D'autres commencent à se couvrir de croûtes jaunâtres.

Les jours suivants, la dessiccation s'achève. Les croûtes tombent du onzième au douzième jour, les cicatrices blanches et ombiliquées restent apparentes pendant longtemps.

Toutes les fois qu'on effectue ainsi l'insertion vaccinale chez le lapin sans produire de lésions profondes du derme, on obtient des résultats excellents. Ce mode opératoire est donc celui que l'on devra toujours adopter.

La pulpe vaccinale recueillie le quatrième ou le cinquième jour avec une curette à bord tranchant est assez abondante et très active. On peut l'utiliser soit pour vacciner des enfants, soit pour reporter sur des génisses, soit pour inoculer de nouveaux lapins.

Le vaccin qui donne une éruption satisfaisante chez le lapin ne s'atténue pas ensuite par passages successifs de lapin à lapin.

Il peut être réinoculé avec plein succès, après huit ou dix passages par le lapin, sur la génisse ou sur l'enfant. L'éruption vaccinale chez la génisse et chez l'enfant conserve les mêmes caractères.

Toutes les fois que nous avons vacciné des lapins en suivant la technique que nous venons de décrire, avec des vaccins de génisse dont la virulence a été vérifiée par l'inoculation positive chez l'enfant, nous avons obtenu des éruptions très régulières. Lorsque au contraire, chez la génisse et chez l'enfant, le vaccin ne donnait que des pustules médiocres, il ne prenait pas chez le lapin.

Le lapin est donc moins réceptif que la génisse et que l'enfant. Seuls les vaccins très virulents donnent chez lui de belles éruptions.

Il s'ensuit que cet animal peut être employé pour le contrôle de la virulence des récoltes vaccinales dans les Instituts vaccinogènes.

C'est ce que nous faisons maintenant d'une façon systématique à l'Office vaccinal de l'Institut Pasteur de Lille. Toutes nos récoltes sont éprouvées sur deux lapins avant d'être distribuées. Nous avons tout lieu de nous féliciter de cette pratique : elle nous épargne depuis deux ans les incertitudes continuelles dont souffrent trop souvent les établissements vaccinogènes sur la virulence de leurs produits.

II

L'IMMUNITÉ VACCINALE CHEZ LE LAPIN

MM. Béclère, Chambon et Ménard (Ces *Annales*, janvier 1896, décembre 1898 et février 1899) ont déterminé avec beaucoup de soin le moment auquel apparaît, chez la génisse, l'immunité vaccinale, lorsqu'on inocule le vaccin par scarification, ou par voie sous-cutanée, ou par voie intra-veineuse.

Chez le lapin, cette immunité apparaît, quelle que soit la voie d'introduction, beaucoup plus tôt. Nos expériences montrent que, après l'insertion superficielle sur la peau du dos rasée, l'immunité est acquise le 6e jour;

Après l'inoculation sous-cutanée, le 6e jour également;

Après l'inoculation intra-veineuse, le 5e jour.

Nous avons introduit le vaccin sous la dure-mère après trépanation, et directement dans la substance cérébrale, pour mettre les éléments virulents hors de l'atteinte des leucocytes. L'immunité s'obtient ainsi comme par l'inoculation sous-cutanée, le 6e jour.

Le liquide céphalo-rachidien recueilli le 4e jour après l'introduction du vaccin sous la dure-mère ne présente aucune virulence. Par contre, un fragment de cerveau prélevé le 4e jour après l'inoculation intra-cérébrale, broyé et étalé sur le dos fraîchement rasé d'un lapin, a développé une éruption dont l'authenticité a été démontrée par l'échec d'une vaccination ultérieure. Ce même fragment de cerveau, ensemencé dans le bouillon de viande et sur gélose, n'a donné aucune culture microbienne.

La même expérience, répétée le 7e jour après la vaccination, est restée négative : l'inoculation d'un fragment de cerveau sur le dos d'un lapin neuf n'a produit aucune éruption.

L'inoculation intra-oculaire de très petites quantités de vaccin dilué donne l'immunité le 6e jour. L'humeur aqueuse prélevée purement, 24 heures après, est aseptique et n'est plus douée de virulence lorsqu'on la reporte sur le dos d'un lapin neuf fraîchement rasé.

Le vaccin introduit dans la trachée, dans le poumon ou dans

la plèvre, confère l'immunité vaccinale sans produire de lésions apparentes. Les tissus de ces organes enlevés le 4e jour ne possèdent aucune virulence.

Lorsqu'on fait pénétrer directement le vaccin dans la circulation par voie intra-veineuse, on n'observe jamais chez le lapin d'éruption spontanée sur les muqueuses, comme M. Chauveau en a signalé sur le cheval. *Mais si, dans les premières 24 heures qui suivent l'introduction du vaccin dans les veines, on rase l'animal sur le dos, on voit apparaître le 3e jour, sur la région rasée, une quantité de pustules parfaitement caractéristiques.* Aucune pustule ne se forme dans d'autres régions.

La même expérience renouvelée chez d'autres lapins 48 heures, 3 jours, 4 jours après l'inoculation du vaccin dans les veines, ne donne plus lieu à aucune éruption.

Les éléments virulents du vaccin restent donc en circulation dans le sang pendant les premières 24 heures, et ils conservent une tendance marquée à se localiser dans le derme, au niveau des légères érosions produites par le rasoir. Là seulement ils forment des pustules apparentes.

Nous avons sacrifié des lapins successivement 24 heures, 48 heures, trois, quatre et cinq jours après leur avoir injecté une assez grande quantité de vaccin dans les veines, en vue de rechercher si l'agent virulent se localise dans quelque organe. Nous avons prélevé dans ces conditions le sang, le foie, le rein, la rate, le poumon et la moelle osseuse.

Ces organes, réduits en pulpe, étaient étalés sur la peau du dos de lapins neufs fraîchement rasés. Jamais ils n'ont produit d'éruption ni l'immunité vaccinale. Il en était de même du sang pur défibriné.

Le vaccin de génisse ou de lapin, desséché et broyé finement, donne très bien l'immunité vaccinale lorsqu'on en saupoudre les muqueuses du nez ou la conjonctive. Il se produit alors sur la pituitaire ou sur la conjonctive de très petites vésico-pustules, qui évoluent en cinq à six jours et se cicatrisent sans former de croûtes. Il serait possible de vacciner par ce moyen. Les peuples orientaux variolisent d'ailleurs, actuellement encore, en introduisant dans les narines de leurs patients des petites boules d'ouate saupoudrées avec des croûtes de pustules de varioleux.

L'immunité vaccinale s'obtient donc, chez le lapin, quelle que soit la voie par laquelle on introduit le vaccin. Mais celui-ci ne semble pouvoir se cultiver ou se multiplier dans aucun organe où les leucocytes ont accès, en dehors de la surface cutanée. La lésion dermique est indispensable à l'implantation et à l'évolution du vaccin.

III

ESSAIS DE CULTURE IN VIVO DE L'AGENT VIRULENT DU VACCIN

orsqu'on examine au microscope, avec les plus forts grossissements, de la lymphe vaccinale recueillie au 4e jour, en tubes capillaires, avec toutes les précautions de pureté possibles, on n'y trouve que très peu et quelquefois pas de bactéries colorables par les méthodes usuelles. A l'état frais, on y observe en revanche une multitude de grains extrêmement petits, réfringents, mobiles, qui semblent bien être les éléments virulents du vaccin, car on ne les rencontre jamais dans le sang ni dans les exsudats recueillis chez les animaux en état d'éruption vaccinale.

Dans les pulpes vaccinales glycérinées, ces grains sont plus gros, immobiles. On remarque qu'ils sont d'autant plus nombreux que le vaccin est de meilleure qualité, et quand on a l'habitude d'étudier les vaccins au microscope, on peut presque sûrement affirmer, d'après le nombre de ces granulations réfringentes et libres, que le vaccin sera bon ou mauvais.

Malheureusement tous les essais de culture qui ont été tentés jusqu'à présent n'ont donné aucun résultat positif. Aucun des microbes cultivables du vaccin n'est susceptible de reproduire l'éruption vaccinale. Tous les milieux artificiels expérimentés par de nombreux auteurs et par nous-mêmes ont échoué.

La chose la plus difficile est d'obtenir du vaccin *pur de tout microbe, cultivable dans les milieux artificiels* et capable, cependant, de développer des pustules lorsqu'on l'insère sur la peau fraîchement rasée.

On connaît depuis longtemps la propriété que possède la glycérine de débarrasser les pulpes vaccinales, après 1 ou

2 mois de séjour en tubes scellés à l'abri de l'air, de la plupart des bactéries qu'elles renferment au moment de la récolte. Cette propriété n'est pas aussi absolue qu'on l'a affirmé. Les vieux vaccins glycérinés âgés de 2 mois à 2 ans ne renferment en effet plus de microbes cultivables sur gélatine ou sur gélose, mais si on les ensemence sur bouillon de viande, et si on les porte à l'étuve à 37° pendant 2 ou 3 jours, ils donnent constamment lieu à un développement microbien.

Nous avons cherché à purifier le vaccin par une autre méthode.

On prépare le péritoine d'un lapin au moyen d'une injection préalable de 10 à 20 c. c. de bouillon de viande, de manière à y provoquer la formation d'un exsudat. 4 ou 5 heures après, on introduit dans le péritoine ainsi préparé, une petite quantité de vaccin frais glycériné, délayé dans 1 c. c. de bouillon. On attend 4 heures et on retire purement l'exsudat à l'aide d'une ponction ou en sacrifiant l'animal.

Le liquide ainsi recueilli est ensemencé dans les milieux artificiels. On trouve le plus souvent qu'il est aseptique : il ne cultive pas dans le bouillon de viande. Si on l'insère sur le dos d'un lapin neuf, on constate qu'il produit quelques pustules isolées, peu nombreuses, mais très caractéristiques, dont on démontre du reste l'authenticité par l'échec d'une vaccination ultérieure.

Les éléments virulents du vaccin ne se sont donc pas multipliés dans le péritoine du lapin ainsi préparé. Les leucocytes ont fait disparaître les microbes étrangers, en respectant au moins une partie des éléments vaccinaux, mais il n'y a pas eu culture à proprement parler, puisque le résultat de l'inoculation de l'exsudat sur la peau du lapin neuf a produit un effet semblable à celui qu'on aurait obtenu par l'inoculation d'un peu de vaccin très dilué.

Nous avons pensé à supprimer ces effets de dilution en introduisant le vaccin non plus dans le péritoine préparé d'un lapin neuf, mais dans celui d'un lapin en pleine éruption vaccinale au troisième jour. Dans quelques expériences ainsi effectuées nous avons obtenu, après 3 h. 1/2 de séjour dans le péritoine, des exsudats qui, reportés sur des lapins neufs, ont produit des éruptions confluentes, et qui ne cultivaient pas dans les milieux

artificiels. Mais il arrive fréquemment, surtout lorsqu'on introduit dans le péritoine de la pulpe glycérinée au lieu de pulpe fraîche, que les exsudats, recueillis après 4 heures, ne soient plus virulents du tout et ne donnent que de rares pustules.

Nous avons aussi essayé, sans succès d'ailleurs, la culture des exsudats vaccinaux aseptiques en sac de collodion ou par passages successifs de péritoine à péritoine, chez des lapins en pleine éruption vaccinale au troisième et quatrième jour.

Il ne semble donc pas possible d'obtenir une multiplication ou une culture des éléments virulents du vaccin dans les exsudats normaux du lapin. Mais en laissant séjourner plus ou moins longtemps les vaccins dans le péritoine des animaux préparés, on peut obtenir des vaccins aseptiques, ne contenant aucun microbe cultivable dans les milieux artificiels, et cependant capables de produire des pustules vaccinales et l'immunité.

CONCLUSIONS

I. — L'inoculation de la vaccine au lapin est toujours suivie d'une éruption confluente de petites pustules très riches en lymphe, lorsqu'on prend la précaution de ne pas insérer le vaccin dans des scarifications, mais d'étaler simplement la substance virulente sur le derme fraîchement rasé.

II. — Le lapin est un excellent animal de contrôle permettant de vérifier la virulence des vaccins recueillis sur les génisses et sur les enfants, ainsi que celle des vieilles conserves glycérinées.

III. — La multiplication des éléments virulents du vaccin ne paraît s'effectuer chez le lapin dans aucun autre organe que la peau.

IV. — On peut obtenir des vaccins aseptiques, c'est-à-dire ne donnant lieu à aucun développement microbien dans les milieux artificiels, en les purifiant par un séjour de quelques heures dans le péritoine de lapins préparés par une injection préalable de bouillon. Les leucocytes font alors disparaître les microbes étrangers et respectent plus longtemps les éléments virulents du vaccin.

CONTRIBUTION A L'ETUDE CAUSALE DES MODIFICATIONS D'ÉTAT DES COLLOIDES

SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

DE LA

MICELLE ALBUMINOÏDE

PAR LE Dr SWIGEL POSTERNAK[1]

V

AFFINITÉ DE LA MICELLE ALBUMINOÏDE ET SON RÔLE DANS LES PHÉNOMÈNES DE LA PRÉCIPITATION. — MÉCANISME DE LA PRÉCIPITATION D'APRÈS M. VIRCHOW, M. NASSE ET M. HOFMEISTER. — RELATION ENTRE L'ÉQUIVALENT ENDOSMOTIQUE ET LES CONCENTRATIONS NÉCESSAIRES A LA PRÉCIPITATION.

L'hypothèse que nous avons proposée sur le rôle respectif des molécules non dissociées et des ions libres, complétée par la notion sur l'influence de la mobilité des ions, nous a permis d'expliquer d'une façon satisfaisante tous les phénomènes étudiés précédemment, et nous a même amenés à la découverte d'une propriété inconnue des albuminoïdes. Il y a pourtant des faits qui ne s'accordent pas bien avec cette hypothèse, au moins dans la forme que nous lui avons donnée jusqu'ici.

La soude et la potasse caustiques se dissocient dans l'eau aussi bien que les acides et les sels. Et cependant, il est impossible de précipiter les albuminoïdes de leurs solutions dans la soude avec les alcalis plus concentrés[2]. Ce phénomène se rattache à d'autres faits qui ont dû nous frapper déjà à l'étude du tableau I.

1. Suite : Voir le n° de février de ces *Annales*.

2. Les acides organiques tels que l'acide acétique, oxalique, tartrique et citrique, les seuls essayés par moi, ne possèdent pas non plus la propriété de précipiter les solutions acides des albuminoïdes, même lorsqu'on les ajoute en grand excès. Et pourtant ces acides se dissocient très peu et présentent par conséquent un nombre très grand de molécules non dissociées. Disons de suite que c'est un phénomène d'un autre ordre que celui auquel appartiendrait la non précipitabilité avec les alcalis ou la différence dans les concentrations des halogènes, comme on le verra plus loin.

On y voit, en effet, que la concentration moléculaire des substances minérales qui arrive juste à précipiter les albuminoïdes du *Picea excelsa* est, en moyenne, de 0,370 pour les chlorures, de 0,212 pour les bromures, et de 0,84 pour les iodures. Comme, d'une part, les électrolytes binaires, abstraction faite pour les acides, se dissocient dans l'eau d'une façon presque identique, et comme, d'autre part, les mobilités des ions Cl, Br, I sont également très voisines, on serait en droit de s'attendre, si notre hypothèse correspondait à la réalité de tous les faits, à ce que les concentrations moléculaires fussent les mêmes pour tous les sels binaires sans exception. L'expérience nous a amené cependant à des nombres fort différents.

Le phénomène de précipitation semble donc être beaucoup plus compliqué. Il y a, évidemment, encore d'autres facteurs, jouant un rôle dans les modifications d'état des albuminoïdes, qui nous ont échappé jusqu'ici et que nous allons essayer de déceler.

On croit généralement que la précipitation des albuminoïdes sous l'influence des sels est due à ce que le sel, ayant une affinité plus grande pour l'eau, prive la matière protéique d'une partie du dissolvant dont elle a besoin pour être tenue en solution.

C'est M. Virchow[1] qui a, le premier, autant que je sache, proposé cette explication, après avoir constaté que « la précipitation est d'autant plus rapide et complète que l'attraction des cristaux (des sels) pour l'eau est plus grande, autrement dit, que les cristaux sont plus solubles ».

Pour M. Nasse[2], la cause de la précipitation est la même, mais le phénomène de modification d'état des colloïdes lui paraît plus compliqué. Si les sels n'agissaient que par leur affinité pour l'eau, on devrait pouvoir déterminer pour chaque sel le degré de son affinité, en mesurant sa concentration au moment de la précipitation du colloïde; le rapport entre les concentrations a et b de deux sels, nécessaires pour précipiter un colloïde, devrait être égal au rapport des concentrations a_1 et b_1 des mêmes sels pour un autre colloïde. M. Nasse a mesuré ces concentrations, par sa méthode décrite plus haut, pour les sulfates

1. *Virchow's Archiv.* T. VI, p. 572, 1854.
2. *Loc. cit.*, p. 506-507.

d'ammonium et de magnésium en présence de différents colloïdes, et a constaté que leur rapport est loin d'être constant. Pour la gélatine il était de 0.84, pour le blanc d'œuf 1,05, pour le sérum sanguin 0,93, pour l'amidon, le glycogène et la dextrine 1,99. L'auteur conclut que « l'existence des rapports particuliers entre les sels neutres et les albuminoïdes est plus que probable, et que les sels entrent vraisemblablement avec ceux-ci en des combinaisons, peut-être moins stables, mais analogues à celles qui sont formées avec les sels des métaux lourds. »

M. Hofmeister est un partisan convaincu de la théorie de la précipitation par soustraction simple de l'eau, qui seule s'adapterait parfaitement aux résultats de ses expériences. L'ordre dans lequel se suivent les sels, au point de vue de leurs concentrations au moment de la précipitation, serait le même quel que soit le colloïde étudié.

Le lecteur donnera difficilement son assentiment à cette appréciation, lorsqu'il examinera en détail le tableau synoptique des expériences de M. Hofmeister et de M. Lewith que nous transcrivons dans la note [1].

Quoi qu'il en soit, l'explication du phénomène de précipita-

1. Ce tableau est emprunté au travail de F. Hofmeister : Zur Lehre von den Wirkungen der Salze. *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakologie.* T. XXIV, p. 247, 1888. Les nombres présentent les concentrations moléculaires nécessaires à la production d'un précipité.

RÉACTIF	Globuline du sérum.	Globuline du blanc d'œuf.	Gélatine.	HYDRATE DE FER	Oléate de soude.
NaCl	4,02	3,90	5,16	0,62	1,36
KCl	3,91	3,94	—	0,63	—
NaBr	—	—	—	0,67	1,56
KBr	—	—	—	0,67	—
NaI	—	—	—	0,64	1,34
KI	—	—	—	0,66	—
$NaNO_3$	6,73	6,64	7,81	0,75	1,65
KNO_3	—	—	—	0,74	—
$NaClO_3$	—	7,13	—	0,85	1,60
$KClO_3$	—	—	—	0,84	—

tion par soustraction de l'eau semble juste en apparence et aurait pu être admise à la rigueur dans le cas où on sature presque complètement le liquide par un sel quelconque, mais dans nos expériences, où la concentration dépasse rarement le taux de 2 0/0, elle serait vraiment hors de propos, d'autant plus qu'on peut *saturer* les solutions acides des albuminoïdes de *Picea excelsa*, qui précipitent sous l'influence de peu de sels, avec du saccharose, sans qu'on y arrive même à provoquer un trouble. Si même on voulait se placer à ce point de vue, il faudrait admettre, en s'appuyant sur nos nombres, que l'affinité de l'eau pour les chlorures, les bromures, les iodures et les alcalis fixes soit très différente. Elle devrait être quatre fois à peu près plus grande pour les iodures, deux fois pour les bromures, que pour les chlorures, presque nulle pour les alcalis.

Faut-il ajouter que cette supposition ne correspond pas à la réalité? Il suffit de parcourir les nombres obtenus par les physiciens qui se sont occupés de la diffusion sans membranes de ces matières minérales dans l'eau pour se convaincre que s'il y a une différence mesurable entre la rapidité de l'hydrofusion de différents cristalloïdes, elle est toujours assez petite et souvent dans un sens contraire à ce que nous avons observé dans nos expériences [1].

Le trait de lumière qui m'a permis de découvrir le nouveau facteur dans le problème étudié par nous me fut donné par le travail de M. Jolly [2] sur la diffusion des cristalloïdes à travers des membranes d'origine animale. La question préoccupe les physiologistes depuis fort longtemps et à juste titre, à cause de l'importance du rôle que jouent les membranes dans les échanges nutritifs des êtres supérieurs.

M. Jolly a introduit dans la science la notion du *coefficient endosmotique*, qui est le rapport qui existerait entre la quantité d'une substance qui sort d'un dialyseur fermé par une membrane animale et le volume d'eau qui y vient à la place. Ce rapport serait constant pour chaque substance minérale examinée, il serait indépendant de la concentration de cette dernière et ne varierait qu'avec la nature de la substance.

1. Voir les tableaux de *Scheffer. Zeitsh. f. physik. Ch.* T. II, p. 390, 1888.
2. Experimentelle Untersuchung en über Endosmose. *Poggendorf's Annalen.* Bd. 78, p. 261, 1849.

Dans le tableau VI nous présentons quelques chiffres empruntés à MM. Jolly et Fick ; mais, pour faciliter la comparaison, nous calculons la réciproque des équivalents endosmotiques indiqués par ces auteurs, l'équivalent exosmotique, par conséquent ; nous le divisons par le poids moléculaire, et nous cherchons le rapport des valeurs obtenues pour l'acide sulfurique, l'iodure de potassium, le chlorure de sodium et la potasse.

TABLEAU VI

Substance	ÉQUIVALENT endosmotique.	AUTEUR	ÉQUIVALENT EXOSMOTIQUE	ÉQUIVALENT EXOSMOTIQUE / P.M	Les nombres de la colonne précédente ramenés à l'unité pour la potasse.
H_2SO_4	0,39	Jolly	2,560	0,052	63
KI	1,093	Fick[1]	0,915	0,0551	67
NaCl	4,30	Jolly	0,232	0,0040	49
KHO	215,00	«	0,0046	0,000082	1

Nous y voyons que le rapport du nombre des molécules de différentes matières qui passent à travers la membrane, pour la même quantité d'eau qui entre dans le dialyseur, est de 1 : 49 : 67 : 63. Mais plus vite une substance passe à travers une membrane, plus grande peut être regardée son attraction ou son affinité pour cette dernière. Et comme la membrane animale est principalement composée par des matières appartenant à la classe des albuminoïdes, on est jusqu'à un certain point autorisé à conclure que l'affinité des albuminoïdes de la membrane est différente par rapport aux substances minérales dont nous venons de comparer les équivalents endosmotiques.

Or l'acide sulfurique, comme le montre le tableau VI, passe le plus rapidement à travers la membrane, il possède donc l'affinité la plus grande pour les albuminoïdes de celle-ci. Nous sommes frappés de constater que le même acide précipite les albuminoïdes de *Picea excelsa* à une concentration moléculaire très faible. Ensuite vient l'iodure de potassium, dont l'affinité pour les albuminoïdes semble être au-dessous de celle de l'acide sulfurique, mais au-dessus de celle du chlorure de sodium. Les concentrations moléculaires pour les iodures dans le tableau I et V sont aussi entre celles des sulfates et des chlorures.

Cité d'après P. Neumeister, *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 2te Auflage, Iéna 1897, p. 25.

La potasse passe le plus lentement, 49 fois moins vite que le chlorure de sodium; son affinité pour les albuminoïdes de la membrane est donc très faible.

La quantité qu'il en faudrait employer pour précipiter les albuminoïdes de *Picea excelsa* de leurs solutions alcalines devrait par analogie être très grande, 49 fois aussi grande que la concentration moléculaire du chlorure de sodium, $0,320 \times 49 = 16,68$ c. m., par conséquent. C'est ce qui correspondait à une solution de soude à 60,7 0/0, condition impossible à réaliser.

Ce calcul est d'ailleurs complètement hypothétique. Il n'est guère prouvé encore qu'il existe une proportionnalité quelconque entre le coefficient endosmotique et la concentration moléculaire du sel capable de précipiter un albuminoïde, les deux phénomènes étant des résultantes de deux séries de facteurs en partie au moins différents. La conception du coefficient endosmotique elle-même est loin d'être démontrée exacte. M. Ludwig[1] n'a pu le retrouver; pour M. Eelchord[2], il ne serait constant que pour des solutions saturées des sels. Les différences dans la rapidité de la diffusion des diverses matières salines à travers une membrane animale par rapport à l'eau, constatées par M. Jolly, sont néanmoins bien réelles, et de leur rapprochement avec les nombres des tableaux I et V il me semble résulter clairement qu'il y a lieu d'admettre une affinité de différentes molécules salines non pour l'eau, mais pour les micelles albuminoïdes.

L'albuminoïde lui-même ne doit pas, par conséquent, être considéré dans le phénomène de précipitation comme un corps inerte, pour la possession duquel luttent les ions et les molécules non dissociées, mais comme une substance dont les micelles sont douées d'une véritable force attractive, d'une propriété haptophore, dirait M. Ehrlich, pour les molécules salines en solution. De l'énergie de cette affinité dépendra au moins en partie le résultat de la lutte.

Je crois être en concordance avec mes nombres en me représentant *provisoirement* le processus de la façon suivante. La matière albuminoïde ne peut être précipitée de sa solution qu'à condition que ses micelles soient entourées d'une couche de molécules salines non dissociées qui les défendraient contre

1. *Poggendorf's Annalen.* T. LXXVIII (1849), p. 397.
2. *Ibidem.* T. CXXVIII (1866), p. 61.

l'action dissolvante des ions. Mais en présence des micelles dissoutes dans le liquide, la distribution des molécules non dissociées n'est plus uniforme comme dans un milieu libre d'albuminoïde. Les micelles, exerçant leur attraction plus ou moins grande sur les molécules non dissociées, suivant la constitution chimique de ces dernières, forment des centres où la concentration des molécules est plus grande que dans l'intervalle entre les micelles.

Plus l'affinité des micelles pour un sel quelconque est grande, plus facilement sera atteinte autour d'elle la concentration des molécules nécessaire pour précipiter l'albuminoïde. L'acide sulfurique, dont l'affinité pour les matières protéiques semble être très grande, comme nous l'avons vu précédemment, arrive à précipiter les albuminoïdes de *Picea excelsa* avec une concentration moléculaire 0,0714, pour l'acide chlorhydrique elle est de 0,388. Ni l'une ni l'autre ne représentent la vraie concentration dont la micelle a besoin pour devenir insoluble. Cette concentration périmicellaire paraît être très grande, puisque avec une solution saturée de soude on n'arrive pas à précipiter l'albuminoïde, son affinité pour l'alcali étant très faible, et la propriété haptophore ne venant pas aider le processus par une agglomération plus dense des molécules non dissociées autour de la micelle.

VI

GÉNÉRALISATION DES RÈGLES TIRÉES DE L'ÉTUDE DES ALBUMINOIDES DE PICEA EXCELSA. — SUR LES ALBUMINOIDES DE CUCURBITA PEPO, DE LUPINUS ALBUS ET LUTEUS, ET DU BLANC D'ŒUF EN SOLUTION ACIDE. — SUR LE QUOTIENT b/a ET LA MODIFICATION DE L'ÉNERGIE DE L'AFFINITÉ MICELLAIRE SOUS L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.

L'affinité pour les molécules minérales étant la seule propriété de la micelle albuminoïde qui participe directement au phénomène de précipitation, il est assez probable que c'est par elle que se distingueront les différentes individualités albuminoïdes, s'il existe réellement un rapport entre les propriétés physiques des matières protéiques et leur constitution chimique.

Comme, d'autre part, le degré d'affinité ne se manifeste pour nous que par les concentrations moléculaires des sels nécessaires à la précipitation, il est à prévoir que les albuminoïdes d'origine différente, placés exactement dans les mêmes conditions

TABLEAU VII

2 C. C

Cucurbita Pepo. Solution des alb. à 1 0/0 dans HCl à 1 0/00.

C.R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C. V.R.	De 8 à 10° C. C %	De 8 à 10° C. C. M. a	Température d'ébullition V.R.	Température d'ébullition C %	Température d'ébullition C. M. b	$\frac{b}{a}$
10 0/0	HCl	36,458	0,27	1,19	**0,326**	0,53	2,09	**0,573**	1,76
20 0/0	NH_4Cl	53,52	0,22	1,98	**0,370**	0,35	2,98	**0,557**	1,50
»	NaCl	58,5	0,21	1,90	**0,325**	0,32	2,76	**0,472**	1,45
»	KCl	74,59	0,32	2,76	**0,370**	0,46	3,74	**0,501**	1,35
10 0/0	NH_4Br	98,03	0,60	2,31	**0,236**	1,58	4,41	**0,449**	1,90
»	NaBr	103,01	0,52	2,06	**0,200**	1,14	3,63	**0,352**	1,76
»	NaI	149,91	0,27	1,19	**0,079**	0,88	3,06	**0,204**	2,58
»	HNO_3	63,048	0,18	0,82	**0,130**	0,54	2,12	**0,336**	2,58
»	NH_4NO_3	80,11	0,29	1,26	**0,157**	0,77	2,78	**0,347**	2,21
»	$NaNO_3$	85,09	0,28	1,23	**0,144**	0,74	2,70	**0,317**	2,20
»	KNO_3	101,18	0,39	1,63	**0,161**	1,10	3,55	**0,351**	2,18
»	1/2 H_2SO_4	49,038	0,12	0,54	**0,110**	∞	∞	∞	∞
»	1/2 $(NH_4)_2SO_4$	66,1	0,07	0,35	**0,052**	0,16	0,74	**0,112**	2,1
8 0/0	1/2 Na_2SO_4	71,08	0,07	0,27	**0,038**	0,15	0,56	**0,079**	2,1

demanderont pour modifier leur état des quantités variables de sels, suivant le degré d'affinité de leurs micelles. Pour s'en assurer, on n'a qu'à répéter les expériences précédentes avec des albuminoïdes d'autres provenances. Nous le ferons d'autant plus volontiers que ceci nous permettra de démontrer que les régularités observées dans le cas de *Picea excelsa* n'appartiennent pas spécialement aux albuminoïdes du sapin rouge, mais se retrouvent aussi chez les matières protéiques d'autres graines végétales, même chez l'albuminoïde du blanc d'œuf, et peuvent, par conséquent, prétendre à la généralisation.

Le tableau VII résume les expériences instituées avec une solution des albuminoïdes de réserve des semences de courge (*Cucurbita Pepo*) à 1 0/0 dans de l'acide chlorhydrique à 1 0/00.

Son analogie avec le tableau I est évidente. Ici, comme là, les nombres pour les sels des mêmes acides sont très voisins, pour les sels de sodium partout inférieurs. La concentration moléculaire la plus faible est celle des sulfates; ensuite viennent, dans l'ordre progressif, les iodures, les nitrates, les bromures et les chlorures.

A la température d'ébullition, les concentrations sont notablement élevées; pour l'acide sulfurique, elle est infiniment grande. L'analogie s'étend même jusqu'au quotient b/a, car les nombres qui l'expriment sont assez rapprochés pour les sels du même acide, et subissent avec le changement de ce dernier une modification dans le même sens que pour les matières protéiques du sapin rouge.

Les considérations développées plus haut sur le rôle respectif des ions, de leur mobilité, des molécules non dissociées et de l'affinité micellaire dans les phénomènes de modification d'état des albuminoïdes de *Picea excelsa* sont donc intégralement applicables aux matières protéiques du *Cucurbita Pepo*.

Mais si le rapport des nombres dans les deux cas est sensiblement le même, leur valeur absolue n'est pas identique. Les concentrations moléculaires sont, en moyenne :

	Chlorures.	Bromures.	Iodures.	Nitrates	Sulfates.
Picea excelsa...	0,370	0,212	0,069	0,131	0,044
Cucurbita Pepo.	0,348	0,218	0,079	0,148	0,067

Les différences, quoique assez petites, n'en sont pas moins réelles; nous les retrouverons plus nettement dans d'autres con-

TABLEAU VIII

2 C. C.

Lupinus albus. Solution des albuminoïdes de réserve à 1 0/0 dans HCl à 1 0/00

C.R	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C. V.R.	De 8 à 10° C. C 0/0	De 8 à 10° C. C. M. a	Température d'ébullition. V.R.	Température d'ébullition. C 0/0	Température d'ébullition. C. M. b	$\frac{b}{a}$
10 0/0	HCl	36,458	0,34	1,45	**0,398**	**1,12**	3,59	**0,985**	2,47
20 0/0	NH_4Cl	53,52	0,24	2,14	**0,400**	0,76	5,51	**1,03**	2,57
»	NaCl	58,50	0,22	1,98	**0,338**	0,52	4,13	**0,706**	2,09
»	KCl	74,59	0,35	2,98	**0,399**	0,90	6,21	**0,832**	2,09
10 0/0	NH_4Br	98,03	0,70	2,59	**0,264**	∞	∞	∞	∞
»	NaBr	103,01	0,64	2,42	**0,235**	∞	∞	∞	∞
»	KBr	119,1	0,82	2,90	**0,244**	∞	∞	∞	∞
»	NaI	149,91	0,33	1,415	**0,094**	∞	∞	∞	∞
»	KI	166	0,54	2,125	**0,125**	∞	∞	∞	∞
»	HNO_3	63,048	0,22	0,99	**0,157**	0,80	2,85	0,452	2,88
»	NH_4NO_3	80,11	0,32	1,38	**0,172**	2,00	5,00	0,624	3,63
»	$NaNO_3$	85,09	0,30	1,30	**0,164**	1,52	4,31	0,507	3,10
»	KNO_3	101,18	0,48	1,95	**0,192**				
»	$1/2\ N_2SO_4$	49,038	0,24	1.07	**0,218**	∞	∞	∞	∞
»	$1/2\ (NH_4)_2SO_4$	66,10	0,10	0.476	**0,072**	0,36	1,52	**0,230**	3,2
8 0/0	$1/2\ Na_2SO_4$	71,08	0,13	0,488	**0,069**	0,42	1,40	**0,197**	2,9

ditions. De l'ensemble du tableau VII, on tire cette impression que les albuminoïdes de *Cucurbita Pepo* demandent un peu plus de sel pour être précipités que ceux de *Picea excelsa*, leur affinité pour les molécules salines semble donc être aussi *un peu moins forte*.

Beaucoup plus manifestes sont les différences que l'on constate dans les cas des albuminoïdes du lupin blanc et jaune, consignés dans les tableaux VIII et IX.

Les régularités y sont les mêmes. La seule chose qui nécessite une explication, c'est l'absence des chiffres pour les bromures, les iodures et le nitrate de potassium dans les parties droites des tableaux. Les signes d'infini ne font qu'indiquer qu'il est impossible de précipiter à chaud les albuminoïdes des lupins par ces sels dans les conditions de nos expériences, où les réactifs ne sont qu'à 1 0/0 et où on n'ajoute pas en règle générale plus de 2 c. c. de réactif.

A l'encontre de ce que nous avons observé pour l'acide sulfurique, il est facile d'obtenir des précipités en travaillant avec des réactifs plus concentrés. En tout cas, il est évident que la concentration qui aurait été nécessaire pour précipiter les albuminoïdes des lupins à la température d'ébullition dépasse le taux de 5 0/0, ce qui confirme la règle générale de l'élévation de la concentration avec la température.

Quant à la valeur absolue des nombres, elle est nettement supérieure à celles des tableaux qui précèdent. La concentration moléculaire est, en moyenne, dans les cas de :

	Chlorures.	Bromures.	Iodures.	Nitrates.	Sulfates
Lupinus albus.	0,384	0,235	0,115	0,171	0,119
Lupinus luteus.	0,522	0,275		0,220	

Ces nombres sont curieux encore à un autre point de vue. En s'appuyant sur les résultats de l'analyse élémentaire des albuminoïdes de réserve de différents lupins (*lupin jaune et bleu*), M. Ritthausen et beaucoup plus tard MM. Osborne et Campbell [1] ont conclu à l'identité absolue des albuminoïdes en question, qu'ils désignent sous le nom de *conglutine*. Or, lorsqu'il s'agit de corps organiques aussi complexes que sont les matières protéiques, l'analogie de la composition élémentaire ne prouve

1. The proteids of lupin seeds, *The Journal of The Amer. chem. Soc.*, t. 19, p. 4542, 1897.

TABLEAU IX

2 C C

Lupinus luteus. Solution des albuminoïdes de réserve à 1 0/0 dans HCl à 1 0/00.

C. R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C.			Température d'ébullition			$\frac{b}{a}$
			V.R	C ° ₀	C. M. a	V R	C ° ₀	C M. b	
10 0/0	HCl	36,458	0,48	1,93	**0,529**	1,86	4,81	**1,319**	2,5
20 0/0	NH_4Cl	53,52	0,36	3,05	**0,570**	0,84	5,91	**1,104**	1,94
«	NaCl	58,50	0,30	2,61	**0,446**	0,66	4,96	**0,855**	1,92
«	KCl	74,59	0,52	4,13	**0,554**	1,12	7,18	**0,963**	1,74
10 0/0	NaBr	103,01	0,74	2,70	**0,275**	∞	∞	∞	∞
«	HNO_3	63,048	0,28	1,23	**0,195**	1,78	3,38	0,536	2,75
«	$NaNO_3$	85,09	0,42	1,73	**0,216**	2,37	5,4	0,674	3,12
«	KNO_3	101,18	0,68	2,53	**0,250**	∞	∞	∞	∞
«	1/2 H_2SO_4	49,038	1,34	3,95	**0,805**	∞	∞	∞	∞

nullement l'identité de la constitution chimique, à cause de la possibilité des isomères innombrables.

Les nombres rapportés par nous plaident en faveur d'une constitution chimique différente des albuminoïdes de réserve appartenant à des espèces différentes de graines de la même famille botanique.

Cette opinion paraît être corroborée par les résultats de l'étude quantitative des produits de décomposition des albuminoïdes de différents lupins. M. Hédin [1] a isolé 2,75 0/0 d'arginine des produits de décomposition de la conglutine du lupin jaune. La même quantité d'arginine fut tirée au laboratoire de M. Schulze, du lupin jaune par la méthode de M. Kossel. J'en ai pu préparer 4 0/0 du poids de l'albuminoïde, par cette dernière méthode, aux dépens de la conglutine du lupin blanc. Enfin, M. E. Schulze obtint un rendement d'au moins 6 0/0 aux dépens d'un mélange des albuminoïdes d'autres lupins [2].

En rapportant les différences absolues des nombres consignés dans nos tableaux à une différence dans l'affinité des albuminoïdes d'origine diverse vis-à-vis des molécules salines, on doit conclure que les matières protéiques de réserve de lupin blanc possèdent une affinité moins grande que celles des semences de courge et de sapin rouge, et beaucoup plus grande que celle du lupin jaune.

Enfin, pour montrer que les albuminoïdes d'origine animale ne se distinguent pas des matières protéiques végétales par d'autres caractères que ceux que nous avons constatés jusqu'ici, et que la modification de leur état résulte du jeu des mêmes facteurs physico-chimiques, je communiquerai encore les expériences faites avec le blanc d'œuf, non à l'état dans lequel il se trouve dans la nature, nous nous sommes expliqués déjà là-dessus, mais préparé d'une façon spéciale.

On se rappelle l'observation, citée déjà, de M. Starke, que lorsqu'on chauffe le blanc d'œuf longuement dialysé, on obtient une solution opalescente qui précipite après neutralisation avec un peu d'acide chlorhydrique. Le précipité est soluble dans les

1. Ueber die Bildung von Arginin aus Proteinkörpern. *Ztsch. f. physiol. Ch.* Bd. 21, p. 154.

2. Je dois ce dernier fait à une communication verbale de M. le professeur E. Schulze, au laboratoire duquel j'ai eu l'honneur de commencer les recherches qui se rapportent à ce travail.

acides d'une concentration faible et les alcalis. Or, déjà M. Starke lui-même a remarqué que les solutions acides précipitent sous l'influence de petites quantités de sels ou d'acides concentrés, et ressemblent, par conséquent, aux solutions acides des albuminoïdes des graines [1].

On a vu également que le blanc d'œuf dilué avec de l'acide chlorhydrique faible, et chauffé à 65-70°, ne coagule pas non plus, et précipite sous l'influence des sels après refroidissement. Le blanc d'œuf ainsi préparé possède donc les mêmes propriétés que les solutions acides du corps opalescent qu'a eu entre les mains M. Starke, et on pouvait espérer d'obtenir avec lui des nombres comparables à ceux des tableaux précédents.

C'est un mélange de 11,5 volumes d'acide chlorhydrique à 1,10/00, avec du blanc œuf neutralisé chauffé à 70° et filtré, qui m'a servi pour les expériences résumées dans le tableau X. Ce mélange est limpide et contient à peu près 1 0/0 d'albumine d'œuf et 1 0/00 d'acide.

Il serait superflu de reprendre une par une les régularités avec lesquelles le lecteur est déjà suffisamment familiarisé. A gauche, rien de nouveau à signaler. A droite, nous observons, par contre, un phénomène insolite jusqu'ici.

Le rapport b/a pour les chlorures est en moyenne 0,84. *Il est, par conséquent, au-dessous de l'unité.*

A la température d'ébullition, il nous faut donc ajouter moins de sel qu'à froid, et c'est la première fois que sous l'influence de la chaleur nous apparaît un phénomène rappelant les idées courantes sur la coagulation. Si, en effet, on avait ajouté à froid du chlorure de sodium jusqu'à la concentration de 0,194, le liquide serait resté limpide et, soumis à l'ébullition, il aurait coagulé comme le blanc d'œuf naturel ou le sérum du sang.

Et alors une question se pose. Ce fait par lui-même ne semble-t-il pas témoigner contre l'influence de l'élévation de la mobilité des ions sur le processus de solubilisation, pour le blanc d'œuf tout au moins? Ce fut, je le reconnais, mon premier sentiment. Mais en continuant la série, je n'ai pas tardé à reconnaître qu'il s'agit ici d'une particularité d'ordre *quantitatif*.

Déjà, en passant aux bromures, on remarque que le quo-

1. J. Starke, *loc. cit.*, p. 47.

TABLEAU X

2 C. C.

Blanc d'œuf dilué avec 11,5 vol. HCl à 1,1 0/00, chauffé à 70° et refroidi

C R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C.			Température d'ébullition.			$\frac{b}{a}$
			V.R.	C 0/0	C. M. a	V.R.	C 0/0	C. M. b	
10 0/0	HCl	36,458	0,40	1,66	**0,455**	0,40	1,66	**0,455**	1,00
20 0/0	NH_4Cl	53,52	0,30	2,60	**0,486**	0,28	2,46	**0,459**	0,94
»	NaCl	58,5	0,30	2,60	**0,446**	0,12	1,13	**0,194**	0,43
»	KCl	74,59	0,41	3,40	**0,457**	0,41	3,40	**0,457**	1,00
10 0 0	NH_4Br	98,03	0,68	2,54	**0,260**	0,78	2,81	**0,287**	1,10
»	NaBr	103,01	0,62	2,37	**0,230**	0,68	2,54	**0,247**	1,07
»	KBr	119,1	0,80	2,85	**0,240**	0,92	3,15	**0,265**	1,10
	KI	166,00	0,48	1,94	**0,116**	0,80	2,86	**0,172**	1,49
»	HNO_3	63,048	0,20	0,91	**0,144**	0,30	1,30	**0,207**	1,44
»	NH_4NO_3	80,11	0,32	1,38	**0,172**	0,46	1,87	**0,234**	1,36
»	KNO_3	101,18	0,46	1,87	**0,184**	0,60	2,31	**0,228**	1,24

tient b/a devient supérieur à l'unité : de 1,08, pour les iodures, il monte jusqu'à 1,49 et pour les nitrates jusqu'à 1,34.

Pour comprendre l'exception pour les chlorures, on n'a qu'à comparer les quotients moyens du blanc d'œuf avec ceux des albuminoïdes étudiés précédemment :

		Chlorures.	Bromures.	Iodures.	Nitrates.	Sulfates.
Picea excelsa	dans NCl.....	1,60	1,94	3,02	2,79	2,63
	dans $C_2H_4O_2$..	1,94	2,45	3,30	3,07	—
Cucurbita Pepo.....		1,51	1,83	2,58	2,29	2,1
Lupinus albus.....		2,31	∞	∞	3,20	3,1
Lupinus luteus.....		2,03	∞	∞	2,93	—
Blanc d'œuf.....		0,84	1,08	1,49	1,34	—

Pour tous ces albuminoïdes, le quotient b/a varie d'une façon uniforme en présence des sels de différents acides. Le blanc d'œuf avec ses produits ne fait que suivre la règle. En présence des iodures, le rapport b/a est deux fois plus fort que le quotient correspondant de *Picea excelsa;* les autres quotients pour les bromures, nitrates et chlorures ne font qu'imiter cet exemple : ils sont tous à peu près deux fois plus petits que ceux des albuminoïdes du sapin rouge. Il arrive que le quotient de ce dernier corps pour les chlorures est de 1,60 ; la moitié est forcément un nombre plus petit que l'unité.

Je ne crois pas qu'on puisse trouver une démonstration plus éclatante de l'analogie parfaite dans les rapports des albuminoïdes d'origine diverse avec les substances minérales.

Puisque nous sommes à la comparaison des quotients, attirons tout spécialement l'attention sur les différences numériques qu'on y constate pour les albuminoïdes d'origine diverse.

Comme les conditions du milieu et de la température étaient absolument identiques dans les expériences parallèles dont résultèrent les nombres exprimant les quotients b/a, les différences observées ne peuvent être rapportées qu'aux micelles albuminoïdes elles-mêmes. Nous connaissons déjà une propriété micellaire variant avec l'albuminoïde à l'étude, c'est l'affinité vis-à-vis des molécules minérales non dissociées. Ce n'est pas la seule. Les micelles albuminoïdes possèdent encore *la faculté de modifier cette affinité sous l'influence de la température et de la modifier différemment.*

Si, en effet, l'affinité micellaire restait la même avec l'éléva-

tion de la température, ou variait d'une façon identique pour tous les albuminoïdes étudiés, il n'y aurait aucune raison pour l'altération du rapport des concentrations qui précipitent à froid et à la température d'ébullition : l'influence de l'affinité micellaire se serait déjà manifestée dans les nombres obtenus à froid, les électrolytes identiques dans les expériences parallèles se seraient dissociés d'une façon analogue et altéreraient la mobilité de leurs ions sous l'influence de la température d'une manière tout à fait comparable.

Si, malgré cela, il nous faut, pour précipiter les albuminoïdes du lupin blanc à la température d'ébullition, relativement plus de sel que pour les albuminoïdes du sapin rouge ou du blanc d'œuf, ce n'est que parce que l'affinité de la micelle a moins augmenté dans le premier cas que dans le dernier.

Les valeurs numériques des quotients b/a nous permettent donc de juger de l'augmentation relative de l'affinité de différents albuminoïdes étudiés par nous sous l'influence de la température. Et si l'on voulait disposer les derniers dans l'ordre régressif de l'augmentation de leur affinité vis-à-vis des molécules non dissociées, on obtiendrait la série suivante :

Blanc d'œuf, *Cucurbita Pepo*, *Picea excelsa*, *Lupinus luteus*, *Lupinus albus*.

L'ordre n'est pas le même à la température de 8 à 10°, comme nous l'avons montré précédemment. Retenons bien ces faits dont les relations vont bientôt être élucidées.

VII

L'AFFINITÉ MICELLAIRE EST D'ORDRE ADHÉSIF. — GROSSEUR ET ÉLASTICITÉ MICELLAIRES. — AGENTS MODIFIANT LA GROSSEUR DE LA MICELLE ALBUMINOIDE.

Le terme affinité, appliqué aux micelles albuminoïdes au cours de ce travail, s'associe dans notre esprit à des conceptions trop différentes pour qu'on puisse l'employer sans spécification, ni commentaire.

On désigne sous ce nom au moins trois catégories de phénomènes, possédant peut-être quelques liens de parenté, mais assez dissemblables pour obéir à des lois fort différentes.

Nous rappellerons en premier lieu les phénomènes de *gravitation* qui obéissent aux lois newtoniennes : leur énergie est en raison directe de la masse et en raison inverse du carré de la distance, et ne dépend aucunement de la constitution chimique des corps en rapport.

Ensuite, viennent les phénomènes d'*affinité chimique*, réglés ceux-là par les lois stöchiométriques. Leur énergie est surtout en relation avec la constitution chimique des matières en contact et peut être exprimée par le maximum du travail extérieur qui résulterait d'une réaction chimique entre elles[1]. Elle est constante pour les mêmes corps, et n'est pas influencée par les conditions dans lesquelles le processus chimique a lieu. La quantité de la matière en présence, la chaleur, la pression, etc., n'agissent que sur l'éclat et la rapidité de ce processus.

Enfin, à la troisième catégorie appartiennent les phénomènes, dits d'*adsorption*, d'attraction par la surface (*Oberfläche attraction* des auteurs allemands), les phénomènes que M. Duclaux désigne sous le nom d'*adhésion moléculaire*. C'est dans cette dernière catégorie que l'on classe habituellement les phénomènes de capillarité, de teinture et d'agglomération moléculaire.

L'adsorption, comme on sait, n'a pas lieu indifféremment entre tous les corps connus ; il est impossible cependant de dire, en l'état actuel de la science, pourquoi elle se manifeste chez certaines substances à l'exclusion d'autres. On présume là un rapport quelconque avec la constitution chimique des corps en contact, mais ce rapport est assurément bien lointain et non moins mystérieux que celui qui existe entre les propriétés physiques et la composition chimique de la matière. Nous ne sommes pas, en effet, plus éclairés sur la question de savoir pourquoi le mercure n'adhère pas au verre, à l'encontre de ce que l'on observe dans le cas de l'eau, que sur la cause de la transparence de l'un de ces corps et de l'aspect métallique de l'autre.

Mais ce qu'on peut affirmer, c'est que dans le cas où l'adhésion a lieu, son énergie est, toutes choses égales d'ailleurs, proportionnelle à l'étendue de la surface de contact.

A laquelle de ces trois catégories appartient l'affinité micellaire pour les molécules salines non dissociées? Est-ce un phénomène de gravitation?

1. Comp. W. Nernst, *loc. cit.*, p. 634.

L'affinité de la micelle albuminoïde est toujours plus grande, disions-nous, pour les sulfates et iodures que pour les nitrates, bromures et chlorures. Le fait que la masse des iodures est plus considérable que celle des bromures et chlorures aurait pu nous engager à expliquer la différence de l'affinité par l'attraction newtonienne ; mais cette hypothèse est à écarter en présence de la constatation que la masse des sulfates et surtout des alcalis n'est pas en rapport avec le degré de leur affinité pour la micelle albuminoïde. Nous avons vu, d'autre part, que l'affinité micellaire augmente notablement avec la température. Or, la masse d'un corps étant invariable sous l'influence de cet agent physique, l'énergie de gravitation devrait rester sans altération.

L'affinité micellaire est-elle alors d'ordre chimique? On sait que l'exercice libre de l'affinité chimique aboutit invariablement à une réaction, à la formation d'une ou plusieurs molécules nouvelles aux dépens de celles qui entrent en contact. Or, rien dans les considérations qui nous ont amenés à la reconnaissance de l'affinité micellaire pour les molécules non dissociées ne justifierait l'admission de la formation de nouveaux corps.

On ne voit guère les albuminoïdes de la membrane animale entrer en combinaisons chimiques avec les substances minérales d'un côté de la membrane pour subir la décomposition de l'autre. Dans le processus de précipitation, les molécules minérales entourent, suivant notre conception, la micelle pour la défendre contre l'action solubilisante des ions. Mais il suffit d'augmenter le nombre ou la mobilité des ions, en ajoutant un peu d'eau ou en élevant la température, pour détruire l'état d'équilibre et pour entamer sérieusement la couche moléculaire, protectrice de la micelle. Ceci ne devrait pas avoir lieu *si les molécules de l'albuminoïde disposées à la périphérie de la micelle* entraient réellement en combinaisons chimiques avec les molécules salines.

D'ailleurs, le fait de variation de l'affinité micellaire sous l'influence de la température suffit à lui seul pour exclure la possibilité de son identification avec l'affinité chimique, dont l'énergie est constante pour les mêmes corps, comme nous l'avons spécifiée plus haut.

L'affinité micellaire, n'étant ni d'ordre de gravitation ni d'ordre chimique, doit donc être considérée comme une *affinité adhésive*.

Cette conclusion va nous permettre de formuler d'une façon plus concrète les points par lesquels se distinguent les albuminoïdes d'origine différente, et de résumer tous nos développements de manière à mieux fixer les altérations que subit l'affinité micellaire sous l'influence des matières minérales en présence.

Nous savons déjà que les albuminoïdes diffèrent par le degré de leur affinité adhésive. Comme l'énergie de l'adsorption est proportionnelle à l'étendue de la surface de contact, il est permis de conclure de la différence de l'affinité à la différence de la surface, et partant à la grosseur inégale des albuminoïdes d'origine diverse.

Les albuminoïdes d'origine différente se distinguent donc par la grosseur de leur micelle.

Nous savons aussi que les micelles en question augmentent leur affinité sous l'influence de la température, et l'augmentent d'une façon différente suivant la constitution chimique des albuminoïdes dont elles dérivent. Les micelles possèdent, par conséquent, la faculté d'augmenter leur surface, de devenir plus grosses sous l'influence de la température, pour revenir après refroidissement à leur grosseur primitive.

On aurait pu désigner cette faculté sous le nom de dilatabilité. Il est préférable de l'appeler *élasticité*, parce que la modification de la grosseur micellaire peut se produire aussi, comme nous le verrons tout à l'heure, sous l'influence d'autres agents que la chaleur.

En se conformant à cette terminologie, nous dirons : *l'élasticité micellaire n'est pas la même chez tous les albuminoïdes étudiés par nous.* A en juger d'après la valeur numérique des quotients b/a, elle est à peu près deux fois moins grande chez les albuminoïdes du sapin rouge et trois fois moins forte chez les albuminoïdes du lupin blanc que chez l'albumine d'œuf.

Enfin l'affinité des micelles pour les molécules salines est variable suivant la composition chimique du milieu dans lequel elles sont placées.

Les albuminoïdes de réserve des graines de semence étudiées par nous, sont insolubles dans les solutions faibles de sels alcalins dont les ions possèdent une mobilité moyenne. Les micelles correspondantes arrivent, par conséquent, à constituer leur zone protectrice aux dépens de la quantité très faible des molé-

cules non dissociées en présence. Leur affinité et, partant, leur grosseur semblent donc être très grandes dans ces conditions.

Elles deviennent moins grandes en présence des acides minéraux (ion positif très mobile) à concentration faible, puisqu'il faut augmenter de beaucoup la concentration de l'acide ou des sels pour précipiter les albuminoïdes.

D'autre part, l'affinité et la grosseur micellaire dépendent aussi du nombre des ions dans le liquide, car si l'on prend, comme dissolvant, au lieu d'un acide minéral, l'acide acétique qui dissocie très peu, les concentrations salines nécessaires à la précipitation sont plus faibles.

De toutes ces prémisses se dégage cette conclusion, que *les ions diminuent la grosseur micellaire plus ou moins énergiquement, suivant leur nombre et leur mobilité.*

Mais, en présence des alcalis fixes, l'affinité micellaire devient extrêmement faible, plus faible que ne le comporte la mobilité de l'hydroxyle, qui est moins grande que celle de l'hydrogène. Les ions négatifs manifestent donc leur action, diminuant la micelle, non seulement par leur mobilité, mais encore autrement, ce qui devient encore plus évident, lorsqu'on se rappelle qu'en présence du Cl, Br et I, dont les mobilités sont presque égales, les affinités et, par conséquent, les grosseurs des micelles n'étaient pas les mêmes.

Cette différence dans l'action des ions positifs, que nous ne faisons que constater ici, pourra être définie et expliquée, lorsque nous connaîtrons comment se comportent, vis-à-vis des sels, les albuminoïdes en solution alcaline, dont nous allons aborder l'étude.

VIII

ALBUMINOIDES EN SOLUTION ALCALINE AU POINT DE VUE DE LEURS RAPPORTS AVEC LES SELS. — ENANTIOMORPHISME TABELLAIRE.

Lorsqu'on essaie l'action précipitante des sels sur les solutions des albuminoïdes d'origine diverse dans la soude à 1,09 0/00, équimoléculaire avec l'acide chlorhydrique à 1 0/00, on constate que nos réactifs, excepté toutefois les sels d'ammonium, n'arrivent guère à provoquer la précipitation.

Le nombre des ions est un peu plus grand dans nos solutions acides (degré de dissociation = 0,95), que dans les solutions alcalines (degré de dissociation = 0,89). Dans les premières, l'ion $^{+}_{H}$ possède une mobilité 318, dans les secondes $^{-}_{OH}$ une mobilité 174, presque deux fois moins grande, et cependant dans ces derniers cas la diminution de la surface micellaire est plus énergique. Cette anomalie, sur laquelle nous ne saurions trop insister, est la première de toute une série, dont l'analyse nous amènera à des règles de l'action relative de différents ions sur la micelle colloïde.

Cherchons tout d'abord à rendre les solutions alcalines des albuminoïdes précipitables par nos réactifs, — condition indispensable pour l'étude systématique et comparée de leurs rapports avec les sels.

Deux moyens, basés sur la diminution du nombre des ions libres dans le liquide, et que nous avons appliqués déjà avec succès aux solutions acides, sont à notre disposition : 1° on peut remplacer la soude par un autre alcali qui dissocie moins, par l'ammoniaque, par exemple; 2° on peut aussi diminuer la concentration de la soude sans toucher à celle de l'albuminoïde en solution. Les deux moyens se montrent efficaces.

Une solution d'ammoniaque d'une concentration moléculaire 0,0273 présente un degré de dissociation électrolytique 0,026, très faible, comme on voit, par rapport à la soude. La surface des micelles albuminoïdes, exposées à l'action solubilisante d'une quantité d'ions très inférieure à celle qui existe dans le cas de la soude, est moins diminuée, et les micelles arrivent à s'entourer d'une zone de molécules non dissociées d'une concentration saline pouvant être atteinte avec 2 c. c. de nos réactifs, à condition cependant que ces unités physiques ne possèdent pas dès leur origine une grosseur trop faible ou une élasticité très grande. C'est le cas des albuminoïdes des lupins et du blanc d'œuf, qu'il est impossible de précipiter à froid même d'une solution ammoniacale. Nous y reviendrons.

Mais on connaît l'instabilité des solutions titrées d'ammoniaque dans l'eau, surtout à chaud, et on comprend que ce serait s'exposer à une cause d'erreur aussi grande que variable si l'on voulait choisir cet alcali comme dissolvant dans des recherches quantitatives. La soude ne présente pas cet inconvénient.

Une solution de soude à 0,75 0/00 met encore la micelle albuminoïde de *Picea excelsa* en dehors de l'action précipitante de nos réactifs : une solution du même alcali à 0,5 0/00 précipite parfaitement bien. C'est donc à des solutions des albuminoïdes de réserve dans la soude de cette concentration, qui correspond à 0,125 concentration moléculaire, que nous avons eu recours dans les expériences qui suivent.

La méthode est restée la même. On a déterminé, en suivant exactement les règles adoptées précédemment, les concentrations salines nécessaires à la précipitation à froid et à la température d'ébullition, et les nombres obtenus ont été rangés dans des séries comparables à ceux que nous connaissons depuis longtemps.

Or, déjà un examen rapide des tableaux correspondants aux solutions acides et alcalines du même albuminoïde, fait ressortir une particularité très curieuse que je désignerai volontiers sous le nom d'énantiomorphisme tabellaire. *Il y a une interversion complète de tous les rapports numériques dans les deux cas étudiés par nous.*

Le tableau XI nous présente les résultats des expériences instituées avec une solution des albuminoïdes de *Picea excelsa* à 1 0/0. Déjà son aspect extérieur est insolite. Les signes ∞ que nous sommes habitués à voir à droite, à la température d'ébullition, sont reportés à gauche.

Écartons de nos considérations les sels d'ammonium dont les concentrations, partout très faibles, viennent troubler la règle sur la concentration presque identique des sels du même acide. L'exception pour les sels d'ammonium est une confirmation de ce que nous venons de dire à propos des solutions ammoniacales des albuminoïdes. La soude, en effet, comme base plus forte, prend la place de l'ammoniaque dans les sels, et on est en présence d'un cas de précipitation saline d'une solution ammoniacale, équimoléculaire avec la soude à 0,5 0/00. Dans cette solution, les micelles de l'albuminoïde de *Picea excelsa* sont si peu diminuées qu'elles précipitent même en présence du carbonate de soude, malgré la réaction alcaline de ce dernier réactif.

Pour revenir à l'étude des rapports numériques, nous ferons remarquer qu'à l'encontre de ce qui a été observé avec les

TABLEAU XI

2 C. C.

Picea excelsa. Solution des albuminoïdes de réserve à 1 p. c. dans NaHO à 0,5 0/000.

C.R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C.			Température d'ébullition.			$\frac{b}{a}$
			V.R.	C 0/0	C.M. a	V.R.	C 0/0	C.M. b	
20 0/0	NH_4Cl	53,52	0,02	0,198	**0,037**	0,01	0,100	**0,0186**	0,50
»	NaCl	58,50	0,09	0,861	**0,148**	0,04	0,393	**0,0670**	0,45
»	KCl	74,59	0,11	1,04	**0,140**	0,07	0,680	**0,0910**	0,65
10 0/0	NH_4Br	98,03	0,16	0,741	**0,0756**	0,04	0,196	**0,020**	0,26
»	NaBr	103,01	0,54	2,13	**0,206**	0,16	0,741	**0,072**	0,35
»	KBr	119,10	0,52	2,08	**0,175**	0,10	0,476	**0,0402**	0,23
»	NaJ	149,91	∞	∞	∞	0,17	0,785	**0,0523**	—
»	KJ	166,00	∞	∞	∞	0,23	1,035	**0,0622**	—
»	NH_4NO_3	80,11	0,12	0,567	**0,0709**	0,04	0,196	**0,0245**	0,34
»	$NaNO_3$	85,09	∞	∞	∞	0,10	0,476	**0,0560**	—
»	KNO_3	101,18	∞	∞	∞	0,20	0,91	**0,090**	—
»	$1/2\ (NH_4)_2SO_4$	66,10	0,08	0,384	**0,0581**	0,02	0,099	**0,015**	0,26
8 0/0	$1/2\ Na_2SO_4$	71,08	0,36	1,24	**0,174**	0,10	0,380	**0,0534**	0,31
10 0/0	$1/2\ (NH_4)_2CO_3$	48,00	0,17	0,785	**0,164**	0,07	0,339	**0,0707**	0,42
»	$1/2\ Na_2CO_3$	53,00	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

solutions acides, ce sont les concentrations des sels de sodium qui sont les plus fortes, du moins à froid, et ceci n est pas l'effet du hasard. Les concentrations des bromures sont nettement supérieures à celles des chlorures et beaucoup inférieures à celles des iodures, marquées infinies, mais qui, en tout cas, dépassent la concentration de 5 0/0. Or, dans les solutions acides, c'étaient les iodures, au contraire, qui présentaient la concentration la moins notable.

A la température d'ébullition, d'ailleurs, l'ancien rapport revient en partie. Les nombres pour les sels de potassium se relèvent, pour les iodures ils sont un peu plus faibles que pour les chlorures.

Le quotient b/a, qui était en général plus grand que l'unité dans les tableaux précédents, est représenté ici par des fractions régulières. Ce que nous avons exceptionnellement rencontré pour les chlorures dans le cas du blanc d'œuf en solution acide devient donc la règle pour les solutions des matières protéiques dans l'alcali très faible.

L'interversion des rapports va encore plus loin. Dans les solutions acides, le quotient b/a variait avec l'ion négatif des sels. Pour les iodures, il était partout supérieur, ensuite venaient les bromures et les chlorures. C'est juste l'inverse que nous observons dans les solutions alcalines. Le quotient b/a est égal, en moyenne, à 0,65 pour les chlorures, à 0,28 pour les bromures et à 0,17 tout au plus pour les iodures.

On retrouve toutes ces particularités dans le tableau XII qui résume les expériences analogues faites avec les albuminoïdes de *Cucurbita Pepo*. Les différences dans la valeur absolue des nombres sont dues à ce que les micelles de cette origine possèdent une élasticité plus grande que les unités physiques des albuminoïdes de *Picea excelsa*, nous l'avons reconnu plus haut. Un agent de la même force diminue la grosseur micellaire plus sensiblement dans le premier cas, et la concentration du sel à ajouter pour la précipitation est nécessairement plus grande.

Pour les sels d'ammonium, la concentration est relativement plus faible, tout comme dans le tableau précédent. Pour le chlorure de sodium, la concentration à froid est de 1,54 ainsi que pour le chlorure de potassium. Si l'on prend en considération que le volume du réactif, ajouté dans ce dernier cas, dépassait 2 c. c.

TABLEAU XII

2 C. C.

Cucurbita Pepo. Solution des albuminoides à 1 0/0 dans NaHO à 0,5 0/00.

C.R.	RÉACTIF	P M.	De 8 à 10° C. V.R.	De 8 à 10° C. C 0/0	De 8 à 10° C. C M. a	Température d'ébullition. V.R	Température d'ébullition. C 0/0	Température d'ébullition. C. M.	$\frac{b}{a}$
20 0 /	NH_4Cl	53,52	0,10	0,95	**0,178**	0,02	0,198	**0,037**	0,21
»	NaCl	58,5	1,62	8,99	**1,54**	0,32	2,76	**0,472**	0,30
»	KCl	74,59	2,72	11,5	**1,54**	0,70	5,19	**0,697**	0,45
10 0/0	NH_4Br	98,03	0,82	2,8	**0,296**	0,08	0,384	**0,0392**	0,13
»	NaBr	103,01	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
»	KBr	119,1	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
»	NaI	149,91	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
»	KI	166,00	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
»	NH_4NO_3	80,11	∞	∞	∞	0,04	0,196	**0,0245**	—
»	$NaNO_3$	85,09	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
»	KNO_3	101,18	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

et que l'albuminoïde, par conséquent, était un peu plus dilué que d'ordinaire, on comprendra que le nombre indiqué au tableau est supérieur à la concentration réelle pour ce sel.

La même différence de l'élasticité fait que déjà, à partir des bromures, il est impossible d'obtenir des précipités en dehors des sels d'ammonium.

Pour le bromure d'ammonium, la concentration est de 0,296 au lieu de 0,178 pour le chlorure. A la température d'ébullition, elle n'est plus que 0,0392. Malgré l'augmentation de la micelle sous l'influence de la température, sa grosseur est au-dessous de la précipitabilité à la température d'ébullition en présence des autres bromures.

Même le nitrate d'ammonium n'est plus capable de précipiter à froid, tellement sont diminuées les micelles de *Cucurbita Pepo* sous l'action des ions $\overline{NO}$ et $\overline{NO_3}$. La chaleur aidant, les micelles reviennent un peu à leur grosseur primitive et précipitent sous l'influence de ce sel, lorsque sa concentration monte à 0,0245.

Les quotients b/a sont aussi au-dessous de l'unité et ils sont supérieurs pour les chlorures ainsi que pour les bromures.

Les nombres pour les albuminoïdes des semences de courge nous serviront de transition au tableau XIII, qui présente les résultats obtenus avec les matières protéïques du lupin blanc. Les micelles, ayant dès leur origine une grosseur relativement petite, sont facilement mises hors d'atteinte de nos réactifs à froid par une solution de NaHO à 0,5 0/00, et même par une solution équivalente d'ammoniaque. Il est donc impossible de les précipiter à froid. A la temperature d'ébullition, les micelles augmentent un peu et entrent dans le rayon d'action des sels ammoniacaux.

Des rapports analogues ont été trouvés pour le lupin blanc et le blanc d'œuf.

Toutes ces expériences prouvent de nouveau que l'énergie solubilisante des alcalis est plus forte que celle de l'acide chlorhydrique. Les différences entre les albuminoïdes d'origine diverse qui se sont manifestés déjà dans les solutions acides se sont accentuées davantage, grâce à l'action plus profonde de la soude.

Il s'agit seulement d'élucider à quoi est due l'interversion

TABLEAU XIII

2 C. C.

Lupinus luteus. Solution dee albuminoïdes de réserve à 1 0/0 dans NaHo à 0,5 0/00

C. R.	RÉACTIF	P.M.	De 8 à 10° C. V.R.	De 8 à 10° C. C 0/0	De 8 à 10° C. C. M. a	Température d'ébullition V.R.	Température d'ébullition C 0/0	Température d'ébullition C. M. b	$\frac{b}{a}$
20 0/0	NH_4Cl	53,52	∞	∞	∞	0,04	0,393	**0,0734**	∞
«	NaCl	58,5	/	/	/	/	/	/	/
«	KCl	74,59	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
10 0/0	NH_4Br	98,03	∞	∞	∞	0,17	0,785	**0,080**	∞
«	NaBr	103,01	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
«	KBr	119,1	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
«	NaI	149,91	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
«	KI	166,00	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
«	NH_4NO_3	80,11	∞	∞	∞	0,14	0,65	**0,081**	∞
«	$NaNO_3$	85,09	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
«	KNO_3	101,18	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
«	$1/2\ (NH_4)_2CO_3$	66,10	∞	∞	∞	∞		∞	∞
«	$1/2\ Na_2CO_3$	71,08	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

des rapports numériques que nous venons d'analyser, et qui par elle-même confirme d'une façon probante, quoique indirecte, l'existence réelle de ces rapports.

Les solutions acides et alcalines se distinguent en somme au point de vue de la théorie de la dissociation électrolytique par le signe de la charge électrique des ions, auxquels appartient le rôle le plus important dans l'acte de la diminution de la micelle. L'ion H, le plus actif dans les solutions acides, est chargé positivement, l'ion OH des alcalis est négatif. Le renversement des rapports numériques n'est-il pas en relation avec ce caractère diamétralement opposé ?

Ceci nous amène à nous occuper du rôle de la charge électrique des ions dans les phénomènes de modification d'état des albuminoïdes. A l'aide de quelques considérations, basées sur les notions élémentaires de l'électricité statique, il nous sera facile non seulement de démontrer que la cause de l'interversion des rapports est réellement liée à la charge en sens opposé des ions, mais aussi de préciser les règles de leur action relative, ainsi que le mécanisme de leur action solubilisante.

IX

POUVOIR ÉLECTRISANT DES IONS ET DES ÉLECTROLYTES. — POUVOIR ÉLECTRISANT RELATIF DES IONS VIS-A-VIS D'UNE MICELLE CONDUCTRICE ET NON CONDUCTRICE. — LE RAPPORT B/A ET LA MODIFICATION DE LA MOBILITÉ DES IONS SOUS L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — RÉSUMÉ.

Les micelles des albuminoïdes ou des colloïdes, en général, ne sont pas électrisées au moment où on les introduit dans l'eau contenant un électrolyte dissocié. Les ions, étant en mouvement continu dans le liquide, viennent butter à chaque instant contre les particules en suspension ou en solution comme contre les parois du vase. Le résultat de ce contact doit être celui qu'on observe lorsqu'un corps électrisé touche à un autre dont le potentiel électrique est nul ; une partie plus ou moins grande de la charge électrique de l'ion passera aux particules rencontrées par lui.

Plusieurs cas peuvent être envisagés. Le cas le plus simple se présentera lorsque l'électrolyte en solution sera composé par

des ions d'une mobilité égale ou presque égale, comme le chlorure de potassium, par exemple, et lorsque les particules ou les micelles seront bons conducteurs de l'électricité.

Comme la charge électrique de l'ion positif et négatif est toujours la même; comme, d'autre part, les chances de rencontrer les particules en suspension sont égales pour les deux ions à cause de leur mobilité identique, les particules seront électrisées en même temps et au même degré positivement et négativement; elles resteront, par conséquent, sans charge électrique appréciable.

Remplaçons maintenant le chlorure de potassium par l'acide chlorhydrique. Les ions positifs dont le mouvement est à peu près cinq fois plus rapide que celui des ions négatifs auront cinq fois autant d'occasion de rencontrer la particule en solution, ou autrement dit, à chaque instant les nombre des ions $\overset{+}{H}$ qui viendront toucher la micelle sera cinq fois plus grand que celui des ions $\overset{-}{Cl}$. Ceci aura pour conséquence une *électrisation positive* de cette dernière.

Si, au lieu de l'acide chlorhydrique, on prend une solution de soude, c'est l'ion négatif $\overset{-}{OH}$ qui sera le plus mobile, c'est lui aussi qui portera les frais de l'*électrisation négative* de la particule.

Il est évident que la charge électrostatique d'une micelle conductrice augmentera, toutes choses égales d'ailleurs, avec le nombre d'ions qui la toucheront en un laps de temps donné, et on peut, par conséquent, considérer la charge qu'une espèce d'ions abandonnera à la micelle comme fonction de leur mobilité. Cette charge électrostatique nous servira, dans la suite, de mesure du *pouvoir électrisant* d'un ion vis-à-vis d'une micelle.

Les considérations suivantes permettent de donner une expression mathématique plus ou moins approximative à la relation entre le pouvoir électrisant et la mobilité. Soit C, V, R et c, v, r, les capacités, les potentiels électrostatiques et les rayons respectifs de la micelle conductrice et de l'ion, que nous nous représenterons sous forme sphérique, et m le nombre d'ions d'une même espèce qui toucheront à un moment donné la micelle et qui est proportionnel à la mobilité.

En se basant sur la loi du partage des charges électrostatiques, on a, après un contact de la micelle avec m ions,

$$(C + mc)\,T = mcv + CV \qquad (1)$$

où T représente le potentiel du système après le contact.

CV étant égal à zéro et les capacités électrostatiques des sphères étant proportionnelles à leurs rayons,

$$T = \frac{mcv}{C + mc} = \frac{m\frac{r}{R}v}{1 + m\frac{r}{R}} = \frac{mrv}{R + mr}$$

et de l'équation 1.

$$T = mcv - mc.\frac{mrv}{R+mr} = m.\,cv.\frac{R}{R+mr} \qquad (2)$$

Le facteur $\frac{R}{R+mr}$ varie en même temps que le produit mr. D'autre part, R étant très grand par rapport à r ; m variant dans les limites étroites de 1 à 7, comme on peut s'en assurer en comparant les mobilités des ions r variant ; dans les limites encore plus étroites, de 1 à 2, 3 comme on le verra plus loin, on conçoit facilement que les variations de la valeur de ce facteur ne seront pas assez sensibles pour pouvoir se manifester dans les expériences aussi grossières que celle de la precipitation. Il est donc permis, jusqu'à un certain point, de conclure, de l'équation (2), que *la charge électrostatique* Q = C T *communiquée à une micelle conductrice par un ion est directement proportionnelle à la mobilité de celui-ci.*

Pour les différents ions, les nombres étant ramenés à 100 pour l'hydrogène, les pouvoirs électrisants vis-à-vis d'une micelle conductrice peuvent être exprimés par la série suivante :

H	NH_4	Na	K	
100	20,2	14,0	20,5	
OH	Cl	Br	I	NO_3
54,7	20,8	21,0	21,0	19,1

Le pouvoir électrisant d'une molécule ionisée d'un électrolyte binaire sera représenté par la valeur absolue de la somme algébrique des pouvoirs électrisants de ses ions pris avec leurs signes respectifs. La charge de la micelle en présence de cet électrolyte aura le signe de la somme.

C'est ainsi que le pouvoir électrisant d'une molécule dissociée d'acide chlorhydrique est égale à 79.2, de chlorure de potassium 0,3, de soude 40,7. La charge électrostatique de la micelle dans

le premier cas sera positive, dans les deux derniers négative. Ces nombres trouveront leur application plus loin.

Le cas de la micelle diélectrique nous intéresse davantage, les albuminoïdes étant de mauvais conducteurs de l'électricité. Il ne peut pas y avoir, strictement parlant, de partage de la charge électrostatique entre la micelle non conductrice et l'ion. Au moment du contact, les ions ne feront que polariser les micelles et neutraliser les pôles dirigés vers la périphérie de tous les éléments qu'ils toucheront. Ceci aura pour résultat d'électriser ces derniers de même signe que celui des ions en présence.

Comme le nombre d'ions est assez considérable, même dans les solutions diluées des électrolytes, la surface entière de la micelle arrivera à être électrisée tout comme dans le cas étudié précédemment [1]. La différence sera uniquement dans le méca-

1. Lorsqu'on fait passer un courant électrique intense à travers de l'eau qui contient en suspension des particules solides (amiante, graphite, soie, argile, soufre, etc)., on observe un déplacement des particules dans la direction du courant négatif, c'est-à-dire vers la cathode. Les mêmes particules suspendues dans l'essence de térébenthine se déplacent dans le sens inverse, à l'exception du soufre qui continue à cheminer vers le pôle positif. Ce phénomène, étudié surtout par M. Wiedemann (*Pogg. Annalen*, t. LXXXVII, p. 321) et M. Quincke (*Ibid.* t. CXIII, p. 513) fut reconnu par M. Cohen (*Wiedemann's Annalen*, t. LXIV, p. 217) comme un cas particulier d'une loi plus générale qu'il formule de la façon suivante : « Les substances possédant une constante diélectrique supérieure s'électrisent positivement au contact avec des substances dont la constante diélectrique est inférieure ». Ainsi l'eau, avec sa constante la plus forte que l'on connaisse (80,9) s'électrise toujours positivement, les particules suspendues négativement, d'où leur transport vers la cathode. L'essence de térébenthine, dont la constante diélectrique égale à 2,23 est inférieure à celles des solides mentionnés plus haut, à l'exception toutefois du soufre, s'électrise négativement en provoquant une charge positive dans les particules suspendues, qui cheminent dès lors vers le pôle négatif au moment du passage du courant électrique.

Si cette interprétation s'adapte très bien au transport des particules solides en suspension dans l'eau en l'absence des électrolytes, elle est incapable de nous rendre compte des phénomènes observés au passage du courant électrique à travers des solutions colloïdes qui contiennent presque toujours de l'acide ou de l'alcali en plus ou moins grande quantité.

MM. Linder et Picton (*The Journal of the Chemical Soc.*, t. LXXI, p. 568, 1897) ont montré, en effet, que les particules colloïdes dans les hydrosols peuvent se déplacer, suivant leur nature chimique, dans l'un ou l'autre sens. C'est ainsi que l'hydrate de fer, l'hydrate d'argent, l'oxyhémoglobine sont transportés vers l'anode ; le bleu d'aniline, le sulfure arsénieux, l'acide silicique, au contraire, subissent une répulsion du pôle négatif et sont dirigés vers l'électrode positive. (Il y a, cependant, une légère répulsion aussi du pôle positif dans le cas du sulfure arsénieux.)

Ces auteurs, tout en faisant constater la basicité de certains corps qui se déplacent vers le pôle négatif et l'acidité des autres qui se dirigent vers le pôle positif, s'abstiennent toutefois d'une généralisation de cette remarque, et laissent ouverte la question sur la cause de la direction prise par différents colloïdes sous l'influence du courant électrique.

nisme de l'électrisation de la micelle et dans la part qu'y prendra chaque ion individuellement.

Dans le cas de la micelle diélectrique, un ion n'électrise pas toute la surface de la micelle, mais seulement la partie qu'il a pu toucher. Or, cette partie sera nécessairement proportionnelle à la surface du contact de la micelle et de l'ion, laquelle varie, évidemment, en raison directe du carré du rayon de celui-ci.

L'expression analytique de la charge de la micelle diélectrique sous l'influence d'un ion sera donc

$$Q = Kmr^2$$

où K est une constante qui dépend principalement de la polarisation de la micelle et de la charge électrotastique de l'ion.

Pour exprimer en nombres le pouvoir électrisant relatif de différents ions, il nous faut connaître, outre la mobilité, encore le rayon de l'ion qui se laisse, d'ailleurs, déterminer avec un degré de probabilité plus ou moins grand.

On désigne sous le nom de *volume moléculaire* le produit du

Les travaux de M. Hardy (*J. of. Physiol.*, t. XXIV, p. 288, 1899 ; *Zeitschrift f. Physik. Ch.*, t. XXXIII, p. 385) apportent de précieux éléments pour la solution de ce problème.

M. Hardy tritura, entre autres, un coagulum albuminoïde, soigneusement lavé à l'eau distillée, dans un mortier d'agate, de façon à obtenir une division très grande de la matière protéique. Suspendues dans l'eau et placées dans un tube en U, les particules se déposaient assez vite au fond du tube et restaient en place, même lorsqu'on faisait passer un courant électrique assez énergique (100 volts sur une distance de $0^m,10$ entre les électrodes de platine) pendant 48 heures.

Or, lorsqu'on ajouta à l'eau du tube une quantité minime d'acide acétique ou d'alcali fixe, le précipité albuminoïde montait respectivement vers l'anode ou vers la cathode, de manière à atteindre les électrodes au bout de 20 heures.

En présence de l'acide acétique, les flocons albuminoïdes se comportaient donc comme des corps électropositifs, en présence de l'alcali comme des matières électronégatives.

Lorsqu'on précipite l'hydrosol de l'hydrate de fer, qui contient toujours un peu d'acide chlorydrique et qui est électropositif, d'après MM. Linder et Picton, par de l'ammoniaque très faible, les particules coagulées présentent un caractère électronégatif très net. La silice gélatineuse, bien lavée et diluée dans l'eau légèrement alcolinisés, se comporte comme une substance électronégative au passage du courant électrique. Toutes ces observations de M. Hardy correspondent donc parfaitement bien à ce qu'on pouvait attendre à la suite de nos considérations théoriques.

En résumé, le caractère positif ou négatif des colloïdes en présence des électrolytes ne doit être attribué ni à la constante diélectrique de ces matières, ni à leur caractère chimique. Le signe de leur charge électrostatique est subordonnée au pouvoir électrisant plus ou moins grand des ions positifs ou négatifs en présence. La charge électrostatique communiquée par les ions aux micelles colloïdes semble être plus forte que celle qui apparait au contact des particules solides avec de l'eau, et masque complètement le phénomène auquel se rapporte la loi formulée par M. Cohen.

poids moléculaire et du volume spécifique, ce dernier n'étant que la réciproque du poids spécifique d'une substance. Le volume moléculaire est une propriété additive des atomes pour les corps aussi simples que les électrolytes binaires; on peut donc calculer, en partant du poids spécifique d'un acide ou d'un sel, le volume d'un ion, lorsque celui de l'autre nous est connu, ou déterminer directement, là où c'est possible, le volume d'un ion d'après la densité des éléments chimiques à l'état solide ou liquide.

M. Kopp a calculé, en 1855, en partant du poids spécifique des substances organiques à la température d'ébullition, les volumes atomiques de

$$H = 5,5 \quad Cl = 22,8 \quad Br = 27,8 \quad I = 37,5$$

et comme le remarque M. Nernst, ces valeurs doivent correspondre à la réalité, puisqu'elles se rapprochent sensiblement des nombres que l'on obtient pour le Cl et le Br, en les calculant d'après la densité de ces éléments à l'état liquide et à la température d'ébullition.

Nous calculerons les volumes d'autres ions en nous appuyant sur les densités des sels à la température de 0° à 16°, suivant les données que j'ai pu trouver dans la bibliographie. Les valeurs obtenues seront, évidemment, trop faibles par rapport aux chiffres de M. Kopp, mais suffisamment comparables avec eux pour le but que nous poursuivons.

$NH_4 = 14,3 \quad Na = 6,0 \quad K = 16,5 \quad NO_3 = 35,4$ (à partir de l'acide nitrique).

Ceci étant le volume des ions, le rayon r est facile à calculer.

Les valeurs mr^2 ramenées à 100 pour l'hydrogène nous donneront le pouvoir électrisant relatif de différents ions envers une micelle diélectrique.

H	NH_4	Na	K	
100	38,2	14,8	42,8	
OH	Cl	Br	I	NO_3
94,8	53,5	62,0	75,8	66,3

Munis de ces nombres, *il nous suffit d'admettre que la diminution de la micelle albuminoïde sous l'influence d'un ion soit proportionnelle au pouvoir électrisant de ce dernier* pour que toutes les régularités et particularités, que nous avons observées et consi-

gnées dans nos tableaux, trouvent leur explication rationnelle et concordante.

Dans une solution d'un albuminoïde dans l'acide chlorhydrique à 1 0/00, les micelles portent une charge électrique positive égale à 46,5 (100 — 53.5). En présence de la soude de même concentration moléculaire, la charge est négative et correspond à 80. La charge étant presque deux fois aussi grande que dans le cas de HCl, la diminution de la micelle est plus prononcée, d'où l'impossibilité de précipiter l'albuminoïde par nos réactifs.

Lorsqu'on ajoute à la solution acide des albuminoïdes un sel quelconque, les ions positifs de celui-ci viennent augmenter la charge de la micelle ; les ions négatifs tendent, au contraire, à la diminuer. Les ions $\overset{+}{NH^4}$ et $\overset{+}{K}$ agiront proportionnellement à leur pouvoir électrisant qui est de 38.2 et 42,8. Comme le sodium avec son pouvoir 14,8 augmentera le moins la charge de la micelle, cette dernière sera moins diminuée et on aura besoin d'une concentration moindre de sel pour la précipiter. L'explication de la particularité observée avec les sels de sodium dans les solutions acides est donc un peu plus compliquée.

Dans le cas des chlorures, la diminution de la charge correspondra à 53,5 (pouvoir électrisant du $\overset{-}{Cl}$), dans le cas des bromures à 62, dans le cas des iodures à 75,8. La charge électrostatique de la micelle sera donc plus petite en présence des iodures et des bromures qu'en présence des chlorures ; la micelle sera, par conséquent, aussi moins contractée et arrivera à s'entourer d'une zone moléculaire d'une concentration moins forte pour les iodures et les bromures que pour les chlorures, comme nous l'avons constaté en effet dans toutes les solutions acides des albuminoïdes, étudiés par nous, sans exception.

Mais prenons une solution d'un albuminoïde dans la soude à 0,5 0/00. La charge de la micelle étant négative, ce sont les ions négatifs qui viendront augmenter la charge, les ions positifs agiront dans le sens contraire.

Comme l'augmentation de la charge sera la plus notable en présence des iodures, les micelles seront surtout diminuées sous l'influence de ces sels, et les concentrations salines nécessaires pour la précipitation seront accrues.

L'ion $\overset{+}{Na}$ neutralisera moins d'électricité négative que l'ion $\overset{+}{K}$.

c'est pourquoi en sa présence la concentration précipitante sera plus grande.

C'est là l'explication de l'interversion d'une bonne partie des rapports qui nous a frappé à l'étude des solutions alcalines.

Il nous reste encore à montrer pourquoi les quotients b/a sont au-dessous de l'unité et plus grands pour les chlorures que pour les bromures et iodures, inversement à ce qu'on a vu pour les solutions acides.

On se rappelle que le quotient b/a indique le rapport entre les concentrations moléculaires qui précipitent à chaud et à froid. Si ce rapport est plus grand que 1, la micelle nous apparaît diminuée sous l'influence de la mobilité accrue des ions, malgré la dilatation de la micelle provoquée par la chaleur. Un quotient au-dessous de l'unité nous fait penser que l'accroissement de la mobilité des ions n'a pu contre-balancer l'augmentation du volume de la micelle sous l'influence de la température.

En règle générale, là où le quotient b/a est moins grand, on peut conclure à l'accroissement relatif plus fort de la grosseur micellaire comme résultat de l'action antagoniste de la température et de la mobilité accrue des ions.

Or, l'élasticité micellaire est une propriété constante et la dilatation de la micelle est toujours identique pour le même albuminoïde et la même température. Il s'ensuit de là que la variation du quotient b/a dans nos séries doit être attribuée à l'augmentation inégale de la mobilité des ions de différente nature chimique sous l'influence de la même température.

Cette conclusion, tirée par nous des phénomènes de modification d'état des albuminoïdes, correspond parfaitement bien à ce qui a été observé par les auteurs qui ont étudié la variation de la conductibilité électrique des solutions salines sous l'influence de la température (Kohlrausch, Loeb et Nernst, Arrhenius). Les observations recueillies jusqu'ici ne sont pas cependant très nombreuses et ne s'étendent que sur une partie limitée de l'échelle thermométrique.

En s'appuyant sur les faits connus, M. Nernst formule ainsi la modification de la mobilité des ions avec la température. Les nombres augmentent de 2 0/0 par degré à peu près. Le coefficient de température est d'autant plus petit que les mobilités

sont plus grandes, de façon qu'avec l'élévation de la température, les différences entre les mobilités des ions tendent à s'effacer de plus en plus[1].

Les valeurs des quotients b/a me portent à croire que l'augmentation de la mobilité sous l'influence de la température est en rapport inverse non seulement avec la mobilité initiale, mais aussi avec la surface de l'ion. Les mobilités du $\overline{Cl}$, $\overline{Br}$, $\overline{I}$ sont, en effet, presque identiques à 18° et, cependant, leur accroissement à la température d'ébullition est loin d'être égal, comme on peut s'assurer par l'examen des quotients b/a juxtaposés plus haut. Si on les rapporte à l'unité pour les iodures, on a pour les albuminoïdes en solution acide de

		Chlorures	Bromures	Iodures	Nitrates
		—	—	—	—
Picea excelsa	acide chlorhydrique	0,53	0,64	1	0,92
	acide acétique	0,59	0,74	1	0,93
Cucurbita Pepo		0,59	0,71	1	0,90
Blanc d'œuf		0,56	0,72	1	0,90

Concordance des rapports vraiment remarquable si l'on pense qu'ils ont été obtenus avec des albuminoïdes aussi différents.

On voit que l'augmentation de la mobilité pour le $\overline{Cl}$ est la plus forte, puisqu'en neutralisant en partie la charge électrique positive de la micelle à la température d'ébullition, elle l'amène à une grosseur micellaire la plus notable par comparaison avec les autres halogènes. Ensuite viennent dans l'ordre régressif le $\overline{Br}$, le $\overline{NO_3}$ et le $\overline{I}$. Or, c'est dans l'ordre inverse que sont disposés les pouvoirs électrisants de ces ions par rapport à une micelle non conductrice, qui sont représentés par le produit de leur mobilité et du carré de leur rayon.

C'est à des recherches ultérieures et surtout à l'étude de la conductibilité électrique des solutions salines à des températures variables qu'appartient de déterminer si le rapport entre l'accroissement de la mobilité et le pouvoir électrisant des ions est linéaire ou plus compliqué. L'existence de ce rapport est, cependant, dès à présent corroborée par l'inversion des quotients b/a dans les solutions alcalines.

1. W. Nernst, *l. c.*, p. 355. Il est à noter que, d'après les recherches de M. Arrhenius, *Ztsch. f. physikalische Chemie*, t. IV, 1889, le coefficient de température entre 18 et 52° pour la concentration moléculaire 0,5 de KCl est de 218; KBr, 210, KI, 207, KNO_3-218.

En effet, le pouvoir électrisant des ions positifs $\overset{+}{NH_4}$, $\overset{+}{N}$, $\overset{+}{K}$ est plus faible que celui des ions négatifs, leur mobilité doit être plus fortement augmentée à la température d'ébullition si le rapport que nous présumons existe réellement.

En solution acide, où les micelles albuminoïdes sont électrisées positivement, cet accroissement plus fort de la mobilité des ions positifs devrait provoquer une augmentation de la charge électrique des micelles, qui aura pour résultat leur rapetissement encore plus notable. Les concentrations, nécessaires à la précipitation à la température d'ébullition, deviendraient alors plus fortes et le quotient b/a serait au-dessus de l'unité. C'est ce que nous avons observé.

Parmi les ions négatifs, c'est le $\overline{Cl}$ qui a le pouvoir électrisant le moins grand, qui l'augmentera le plus à la température d'ébullition et qui neutralisera, par conséquent, le plus d'électricité positive de la micelle. C'est, en effet, en présence des chlorures que les concentrations moléculaires étaient relativement moins grandes à la température d'ébullition, comme le certifient les quotients qui sont les plus faibles pour les chlorures.

Dans les solutions alcalines des albuminoïdes, où les micelles sont chargées négativement, l'augmentation plus forte de la mobilité des ions positifs aura naturellement un effet inverse. Une plus grande partie de la charge électrique des micelles sera neutralisée à chaud qu'à froid, la charge se trouvera diminuée, la micelle agrandie et les concentrations précipitantes affaiblies, d'où le quotient au-dessous de l'unité.

Et comme les chlorures, grâce à l'accroissement plus grand de la mobilité du $\overline{Cl}$ soutiendront encore le plus l'effet électrisant du $\overline{OH}$, c'est en leur présence que les micelles seront relativement plus petites et demanderont des concentrations plus fortes pour être précipitées. De là le quotient b/a plus fort pour les chlorures que pour les bromures et les iodures.

En un mot, les résultats numériques de l'ensemble de nos expériences se comportent de manière à justifier complètement l'hypothèse : 1° sur la proportionnalité directe entre la charge electrostatique, communiquée à la micelle albuminoïde par les ions libres en présence, et la diminution de la grosseur micellaire; 2° sur la proportionnalité inverse, entre l'étendue

de la surface micellaire et la concentration saline nécessaire à la précipitation d'un albuminoïde en solution ou, plus exactement, entre la grosseur micellaire et le nombre minime de molécules non dissociées, qui suffit pour permettre à la micelle de s'entourer d'une zone protectrice.

Et si une hypothèse a déjà sa raison d'être, lorsqu'elle se montre utile à la simplification et coordination de phénomènes complexes et difficiles à interpréter, celle que nous venons de formuler mérite d'autant plus d'être agréée qu'elle permet de prévoir des faits inconnus, de reconstituer, comme on va le voir, le mécanisme des modifications d'état des colloïdes en général, et de trouver des relations entre les phénomènes dont l'analogie n'était rien moins que reconnue jusqu'ici.

Mais avant d'aller plus loin, il ne serait pas peut-être inutile de résumer en quelques propositions tous les développements qui précèdent.

Aux questions posées dans l'introduction à ce travail sur les propriétés de la micelle albuminoïde, sur les altérations qu'elle subit et sur les agents capables de la modifier de façon à changer la solubité des matières protéiques, on peut répondre à la suite de la discussion raisonnée de nos expériences ce qui suit :

1° La micelle albuminoïde présente deux propriétés physiques pouvant servir à la différenciation des matières protéiques : la grosseur et l'élasticité ;

2° La grosseur micellaire est une propriété variable, sa valeur étant déterminée, d'une part, par l'intensité des agents capables de la modifier; d'autre part, par l'élasticité de la micelle. Cette dernière propriété doit être considérée comme constante ;

3° Parmi les agents capables de modifier la grosseur micellaire, nous avons appris à connaître la chaleur qui l'augmente et les ions libres qui la diminuent. Il serait naturellement prématuré d'en conclure que ce sont les seuls facteurs auxquels la micelle albuminoïde soit sensible ;

4° Les ions diminuent la grosseur de la micelle par la charge électrique qu'ils communiquent à celle-ci. La diminution de la grosseur micellaire est proportionnelle à cette charge ou, autrement dit, au pouvoir électrisant des ions ;

5° Le pouvoir électrisant relatif des ions n'est pas le même vis-à-vis d'une micelle conductrice ou non-conductrice. Dans le premier cas il est proportionnel à leur mobilité ; dans le second, au produit de la mobilité et du carré de leur rayon ;

6° Les charges communiquées à la micelle par les ions positifs et négatifs se neutralisant mutuellement, le pouvoir électrisant d'un électrolyte sera, évidemment, égal à la valeur absolue de la somme algébrique des pouvoirs électrisants des ions, pris avec leur signe respectif. Le signe de la somme indiquera celui de la charge qui persistera chez la micelle après la neutralisation partielle ;

7° Lorsqu'on ajoute un ou plusieurs électrolytes à une solution colloïde dont les micelles portent déjà une charge électrique, les ions possédant le même signe que celui de la charge vont augmenter l'électrisation des particules colloïdes ; les ions de signe opposé vont, au contraire, la diminuer. En changeant le signe de la charge initiale de la micelle, on renverse naturellement tous les rapports, tout ce qui diminuait la charge dans le premier cas, l'augmente dans le second ;

8° La mobilité des ions augmentant avec la température en raison inverse de leur mobilité initiale et de leur surface, le pouvoir électrisant des ions se modifie parallèlement. En chauffant une solution colloïde en présence des électrolytes, on provoque donc une action antagoniste au point de vue de la grosseur micellaire. La micelle est engagée, d'une part, à se dilater ; elle en est empêchée, d'autre part, par l'augmentation de la charge électrique qui lui est communiquée par les ions devenus plus mobiles. Suivant l'élasticité micellaire et suivant la nature des ions en présence, le résultat de cette action antagoniste sera différent : la grosseur de la micelle pourra rester sans altération ou devenir plus ou moins forte ;

9° C'est la grosseur de la micelle, dans les conditions de l'expérience, qui détermine le nombre des molécules non dissociées, et partant la concentration saline qui est nécessaire pour précipiter un albuminoïde, placé dans ces conditions ;

10° Le nombre des molécules non dissociées qui provoque la précipitation est d'autant plus grand que la grosseur micellaire est plus faible.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE AVRIL 1901 No 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ DANS L'INFECTION TYPHIQUE EXPÉRIMENTALE

PAR LE Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Depuis que l'attention des bactériologistes a été attirée sur les cytotoxines, l'étude de l'immunité proprement dite, de l'immunité vis-à-vis des microbes, se trouve un peu délaissée.

Les bactéries ont cédé la place aux cellules animales; les sérums — cytolytiques et anticytolytiques — dont le nombre augmente tous les jours, ne visent que les cellules normales de l'organisme. Si captivantes que soient ces recherches en elles-mêmes, il est évident que l'espoir de pénétrer davantage dans l'intimité des phénomènes de défense de l'organisme fut pour beaucoup dans l'enthousiasme soulevé de toutes parts par cette nouvelle orientation de la microbiologie. Certes, les recherches sur les cytotoxines sont loin d'être épuisées. bien que les principaux sérums cytolytiques soient déjà plus ou moins étudiés ; il reste encore à accomplir une tache non moins importante, qui consiste à rechercher tout le parti que l'on pourra en tirer au point de vue thérapeutique.

Mais lorsqu'on se place au point de vue purement théorique, et que l'on cherche à transporter sur le terrain de l'immunité bactérienne les connaissances acquises au sujet des cytotoxines, on voit que l'espoir des bactériologistes n'est pas encore sur le point de se réaliser.

En effet, la notion la plus importante qui domine l'histoire des cytotoxines est celle qui a été mise en évidence par les

belles recherches de M. Bordet, et qui a trait au rôle respectif de l'alexine et de la sensibilisatrice, ou de la *cytase* et du *fixateur*, d'après la terminologie de M. Metchnikoff.

M. Bordet a, en effet, établi dès 1895 que la destruction des vibrions, mis en contact avec le choléra-sérum, est due à l'action simultanée des deux substances, l'alexine et l'anti-corps spécifique. Or, si l'on se propose d'utiliser cette notion, exacte en elle-même, dans le but de rendre les sérums bactéricides plus efficaces, comme le propose le professeur Wassermann, on ne tarde pas à s'apercevoir que l'analogie entre les sérums cytolytiques et bactéricides ne va pas jusqu'à l'identité.

Dans les deux mémoires[1] que M. Wassermann a consacrés à l'exposé de sa théorie alexique ou cytasique de l'immunité, nous trouvons, à côté des considérations théoriques, des faits expérimentaux d'un grand intérêt, destinés à étayer sa théorie.

Avant de passer à l'examen critique de cette dernière, nous nous empressons de déclarer que tous les faits rapportés par l'auteur, avec sa précision coutumière, sont d'une exactitude absolue; nous les avons répétés nombre de fois et toujours avec les résultats indiqués par l'auteur. Nous sommes donc complètement d'accord pour ce qui concerne la partie expérimentale de ses mémoires, mais où nous nous séparons complètement de M. Wassermann, c'est lorsqu'il s'agit d'en tirer des conclusions.

Après avoir analysé le mécanisme des expériences faites par M. Wassermann, et après les avoir complétées par une série d'autres expériences qui vont être exposées plus bas, nous sommes arrivé à des conclusions non seulement différentes, mais presque diamétralement opposées à celles formulées par le savant allemand.

Pour mettre le lecteur à même de s'orienter dans cette question assez complexe et de pouvoir porter son jugement en toute connaissance de cause, il ne sera pas inutile de résumer brièvement les idées de M. Wassermann et les expériences que celles-ci lui ont suggérées. Comme M. Wassermann le dit lui-même à plusieurs reprises, ses idées lui ont été inspirées par les études récentes sur les cytotoxines.

Le premier mémoire traite de l'immunité artificielle, pas-

1. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1900, n° 18; 1901, n° 1.

sive, le deuxième de l'immunité naturelle. L'idée directrice dans ces deux mémoires est la même ; tous deux tendent à faire ressortir l'importance primordiale des alexines ou des cytases dans les deux sortes d'immunité.

*
* *

Pour ce qui concerne l'immunité naturelle, nous savons par les recherches de M. Metchnikoff et de ses élèves au prix de quel effort persévérant la théorie phagocytaire a pu sortir victorieuse de la lutte contre la théorie humorale. M. Wassermann ne tient pas, évidemment, compte des travaux de l'école phagocytaire, et considère la question de l'immunité naturelle comme non encore résolue; il croit pouvoir la trancher par une expérience qui, d'après lui, est décisive. Voici le raisonnement qui est à la base de cette expérience.

Si, dit-il, l'alexine ou la cytase ne jouait aucun rôle dans l'immunité naturelle, un sérum anticytasique, injecté à l'animal, ne devrait pas affaiblir sa résistance naturelle; par contre, l'animal doit ressentir l'effet nocif de l'anticytase d'autant plus vivement que la cytase est plus nécessaire pour la défense naturelle de l'organisme.

Or, l'expérience conçue dans cet ordre d'idées démontre que le cobaye dont la cytase naturelle a été neutralisée par une injection intrapéritonéale de l'anticytase, se trouve en état de résistance notablement inférieur à celui d'un témoin qui n'a pas reçu d'anticytase; d'où M. Wassermann tire cette conclusion, paraissant très logique au premier abord, que « la résistance naturelle de l'organisme est due principalement à la présence de la cytase », et que « les substances diastasiques, se trouvant normalement dans le sang et capables de détruire les bactéries, constituent le principal moyen de défense dans les maladies infectieuses ».

Voilà pour l'immunité naturelle.

Nous allons revenir tout à l'heure sur cette expérience, que nous étudierons en détail; retenons pour le moment ce fait capital que, d'après M. Wassermann, dans l'immunité naturelle, l'action cytasique ou bactéricide prime tout. L'auteur est à tel point pénétré de ce rôle de la cytase qu'il propose d'introduire dans les usages cliniques le dosage de la cytase, comme cela se pratique pour les autres éléments du sang, l'hémoglobine,

par exemple ; il ajoute qu'il serait de la plus haute importance de pouvoir augmenter artificiellement la teneur du sang en cytase. Mais ici nous touchons à la question de l'immunité artificielle, à laquelle M. Wassermann a consacré un très intéressant mémoire, il y a un an environ.

*
* *

Frappé du peu d'efficacité de la plupart des sérums bactéricides (anticholérique, typhique, streptococcique, pneumococcique, charbonneux, etc.), comparativement avec les sérums antitoxiques (antidiphtérique, etc.), M. Wassermann se demande s'il ne serait pas possible de rendre les premiers plus actifs au point de vue thérapeutique.

Ainsi les sérums bactéricides ont l'immense désavantage que voici : si une dose déterminée de sérum est capable de préserver contre un certain nombre de microbes, il n'est pas du tout sûr qu'en triplant, par exemple, la quantité de sérum, on parvienne à préserver l'animal contre une dose trois fois supérieure de microbes; il arrive, au contraire, toujours ceci que, dès que le nombre de microbes dépasse une certaine limite, le sérum bactéricide, quelle qu'en soit la dose injectée, est impuissant à enrayer l'infection : de là l'inefficacité pratique de ces sérums.

M. Wassermann, s'inspirant des connaissances acquises au sujet des cytotoxines, croit avoir trouvé la clef du phénomène : tous nos sérums bactéricides pécheraient, d'après lui, par l'insuffisance en alexines ou en cytases.

En effet, dit-il, depuis les recherches de Bordet, Ehrlich et Morgenroth et d'autres, on sait que les sérums cytolytiques se composent de cytase et de fixateur, ou d'alexine et de sensibilisatrice, d'après l'ancienne nomenclature; la quantité de cytase, au cours de l'immunisation, reste invariable ; seul l'élément fixateur (Immunkorper) s'accumule dans le sérum de l'animal vacciné ; or, pour qu'un sérum bactéricide puisse être actif, il faut le concours des deux substances, en proportions déterminées, et si l'une d'elles manque, l'action du tout est compromise. Lorsqu'on prépare les sérums bactéricides, on augmente artificiellement la quantité de la substance fixatrice, mais on ne se préoccupe guère d'en faire autant pour la cytase ; pour avoir des sérums bactéricides qui agissent, il faut donc leur ajouter de la cytase ; ce n'est qu'à cette condition que l'on aura des

sérums réellement efficaces, des sérums qui guérissent; et comme la cytase se trouve dans chaque sérum normal, on n'a, d'après M. Wassermann, qu'à ajouter à des sérums bactéricides du sérum normal. En réalité, la question paraît un peu plus compliquée, car les expériences ont montré à M. Wassermann que tout sérum normal ne convient pas à cet effet, que pour chaque sérum bactéricide il faut établir, selon l'animal qui fournit le sérum, une cytase qui lui convienne, une cytase spécifique, pour ainsi dire; l'auteur reconnaît que le choix de la cytase est une tâche délicate, mais pouvant être de la plus haute importance pour la bactériologie appliquée.

Si la thèse fondamentale de M. Wassermann est conforme à la réalité, on ne s'explique pas bien pourquoi il faut chercher si longuement la cytase appropriée, pourquoi la cytase de l'espèce qui sert à l'immunisation ou bien celle de l'animal qu'il s'agit de protéger ne saurait convenir. Mais ceci n'est qu'un détail; ce qui nous importe avant tout, c'est le principe en vertu duquel un sérum bactéricide est, d'après M. Wassermann, rendu beaucoup plus actif, si on lui ajoute de la cytase appropriée.

Ce savant apporte une expérience, sur laquelle nous reviendrons encore et qui semble en effet confirmer sa thèse.

Nous voyons donc que, d'après le savant allemand, c'est par l'addition de nouvelles quantités de cytases à des sérums bactéricides peu actifs par eux-mêmes que l'on arrive à conférer aux animaux une immunité passive, et c'est également à la présence de la cytase normale du sang que les animaux doivent principalement leur immunité naturelle.

M. Wassermann se rallie donc à la conception humorale de l'immunité, entraîné surtout par ses expériences sur le bacille typhique. Or, si on examine la question de près, on voit que l'auteur ne saurait mieux plaider la cause de la théorie cellulaire qu'en arrêtant son choix sur ce microbe, le bacille d'Eberth étant très peu sensible à l'action directe de la cytase de cobaye. Certes, dans le vaste domaine de l'immunité, il y a des cas particuliers où la cytase mise en liberté à la suite de phagolyse, ou bien injectée à un autre animal sous forme de sérum, peut contribuer à la défense de l'organisme; mais le bacille d'Eberth est précisément un microbe vis-à-vis duquel on n'observe jamais d'action bactéricide directe quelque peu notable.

*
* *

Revenons à la première expérience de M. Wassermann, ayant pour but de faire ressortir le rôle de la cytase dans l'immunité naturelle.

Il prend deux cobayes; l'un reçoit en injection péritonéale 3 c. c. de sérum chauffé *anticytasique* (antialexique), mélangé à une dose plusieurs fois mortelle de B. typhique; ce sérum est fourni par un lapin injecté plusieurs fois avec du sérum de cobaye.

Un autre cobaye, qui sert de témoin au précédent, reçoit en injection intrapéritonéale 3 c. c. de sérum *normal* de lapin, chauffé comme le précédent, et mélangé avec la même dose de typhique.

Appelons le premier cobaye — *anticytasique*, et le second — *témoin*.

Le lendemain on trouve le cobaye anticytasique mort, tandis que le témoin continue à se porter bien.

Cette expérience ne paraît pas se prêter, à première vue, à des difficultés d'interprétation, et M. Wassermann en a, en effet, conclu sans hésitation que la mort du cobaye anticytasique était due à ce que la cytase naturelle étant paralysée par l'injection de l'anticytase, le cobaye se trouva de la sorte privé de son principal moyen de défense. Or, si l'on étudie de plus près cette expérience, on ne tarde pas à constater qu'elle comporte des conclusions tout à fait différentes.

Qu'est-ce que le sérum anticytasique? Est-il réellement spécifique, comme le croit M. Wassermann, et n'agit-il que sur la cytase?

Nous savons que, dans le cas qui nous intéresse, il a été préparé par injection du sérum de cobaye à un lapin. Mais c'est aussi par injection du sérum de cobaye au lapin que l'on peut obtenir un sérum antileucocytaire; c'est aussi dans les mêmes conditions que l'on obtient un sérum anti-agglutinant contre le pouvoir agglutinant du sérum de cobaye; c'est aussi par le même procédé que l'on obtient le précipité signalé pour la première fois par M. Tchistowitch [1]; nous ne parlons que pour mémoire du sérum anticoagulant, décrit récemment [2], et que l'on

1. Ces *Annales*, 1899, p. 406.
2. L. Camus, *Comptes rendus*, 1901, et Bordet et Gengou, ces *Annales*, 1901, p. 129.

prépare par le même procédé qui a été employé par M. Wassermann pour obtenir le sérum anticytasique.

Il s'ensuit donc que le sérum dont s'est servi M. Wassermann n'est pas seulement dirigé contre la cytase, et on n'a pas le droit de l'appeler plutôt *anticytasique* que *antileucocytaire*, ou *anti-agglutinant*, ou *anticoagulant*, ou *précipitant*.

Ceci posé, il nous reste à examiner la part qui revient dans l'expérience de Wassermann à chacune des propriétés indiquées de ce sérum complexe, dit anticytasique.

*
* *

Pour cela nous nous n'avons qu'à regarder ce qui se passe dans la cavité péritonéale des deux cobayes de M. Wassermann.

L'exsudat retiré dans la première demi-heure qui suit l'inoculation présente à peu près les mêmes caractères dans les deux cas : il contient relativement peu de microbes, surtout en comparaison avec le nombre de microbes injectés, et extrêmement peu de globules blancs. C'est le stade de la phagolyse.

Déjà au bout d'une demi-heure on peut discerner, entre les deux exsudats, une légère différence qui va en s'accentuant progressivement d'heure en heure. L'exsudat péritonéal du témoin devient de plus en plus riche en leucocytes, comparativement avec celui du cobaye anticytasique. La différence est déjà très nette à partir de la deuxième heure.

Le nombre des microbes pendant les premières heures est sensiblement le même dans les deux cas.

Chez le cobaye témoin, on constate quelquefois, dans le péritoine, quelque rares microbes transformés en boule, mais ceux-ci se perdent dans la masse de microbes intacts.

Ces derniers sont tantôt libres, tantôt réunis en amas plus ou moins considérables.

Chez le cobaye témoin, ces amas se rencontrent plus fréquemment que chez le cobaye anticytasique : dans le liquide péritonéal de ce dernier, on observe surtout des microbes libres, non agglutinés. Nous en verrons plus tard la raison.

Au bout de deux heures environ apparaît dans le péritoine du cobaye anticytasique un précipité grumeleux, plus ou moins abondant suivant les cas.

Les leucocytes qui commencent à affluer aussi chez le cobaye

anticytasique sont fortement agglutinés ; ils sont accolés les uns aux autres, en formant des groupes de 20, 30 et plus.

Les leucocytes du témoin sont pendant ce temps beaucoup plus nombreux et présentent cette différence, comparativement avec le cobaye anticytasique, qu'ils sont uniformément répartis dans tout l'exsudat, comme c'est le cas dans un exsudat normal.

Il va sans dire que l'exsudat du cobaye témoin ne présente pas la moindre trace du précipité albumineux dont il vient d'être question. Ce précipité peut ne faire son apparition qu'assez tardivement, cela varie avec les sérums ; mais dès qu'il apparaît, il revêt la même disposition que les leucocytes. Que ceux-ci soient à l'état isolé ou qu'ils soient agglomérés en amas, ce qui est le cas de beaucoup le plus fréquent, ce précipité s'amasse tout autour des leucocytes, en les noyant dans son épaisseur.

C'est pendant les deux ou trois premières heures qui suivent l'inoculation que se décide le sort de l'animal. Lorsqu'on examine en ce moment l'exsudat péritonéal sur des lames colorées, on constate une phagocytose très prononcée chez le cobaye témoin, tandis que, chez le cobaye anticytasique, elle est à peine ébauchée.

Mais ce n'est pas tant dans le liquide péritonéal lui-même que se décide la question de la vie et de la mort de l'animal ; c'est au niveau de l'épiploon que la lutte est au plus fort.

Déjà un examen rapide d'un frottis d'épiploon, fait une heure après l'injection, ne laisse subsister aucun doute sur l'issue de l'expérience ; car c'est au niveau de l'épiploon que se donnent rendez-vous, d'une part, la plus grande partie des microbes et, d'autre part, la majorité des leucocytes dont dispose le péritoine.

Rarement il nous a été donné d'observer une phagocytose aussi intense que celle qui a lieu au niveau de l'épiploon chez le cobaye témoin, une heure après l'injection du mélange du typhique et du sérum normal : les leucocytes regorgent de microbes ; ils les phagocytent par douzaines à la fois.

Or, rien de pareil sur l'épiploon chez l'autre cobaye, l'anticytasique : à côté de rares leucocytes renfermant le B. typhique, nous voyons que la grande majorité des bactéries sont hors des cellules.

Ajoutons que la forme primitive du microbe est dans tous

les cas conservée, et cela même chez le cobaye témoin ; même à l'intérieur des phagocytes, le B. typhique garde sa forme caractéristique en bâtonnet.

Tels sont les faits que l'on observe au microscope chaque fois que l'on réalise l'expérience de Wassermann.

Maintenant nous sommes assez renseigné pour pouvoir juger quelle est la part qui revient à chacune des propriétés que possède le sérum dit anticytasique.

*
* *

Le sérum employé par M. Wassermann, si on en juge d'après ses indications, a été fortement *anticytasique*. Celui que nous avons employé a été, au début, deux fois moins actif, c'est-à-dire qu'il ne pouvait neutraliser qu'une quantité de cytase deux fois moindre; mais plus tard, au fur et à mesure que nos animaux devenaient plus immunisés, notre sérum ne cédait en rien par sa teneur en anticytase à celui de M. Wassermann. Or, chose curieuse, notre premier sérum, qui n'était que faiblement anticytasique, nous a donné d'aussi bons résultats que celui que nous employâmes ultérieurement.

Ceci faisait déjà présumer que la cytase ne devait pas jouer un rôle prépondérant dans l'expérience de M. Wassermann.

Mais ce qui nous prouva surtout, et d'une façon positive, que le sérum en question doit agir autrement que par sa propriété anticytasique, c'est que, à l'examen microscopique, nous n'avons presque jamais constaté d'action bactéricide *in vivo*.

Supposons en effet pour un instant que le sérum de M. Wassermann tue le cobaye parce qu'il neutralise la cytase de ce dernier, comme le croit M. Wassermann; mais alors il faut nécessairement conclure, pour être logique, que le cobaye témoin, injecté de sérum normal, doit entièrement la vie à sa cytase libre, qui exerce une action bactéricide sur le bacille typhique. Or, quand on examine le liquide péritonéal du cobaye témoin, on n'y trouve que de temps à autre quelques microbes présentant une altération morphologique : ces microbes altérés sont extrêmement rares, surtout si on tient compte du nombre incalculable de microbes injectés, qui n'ont subi aucune influence cytasique; il s'ensuit donc que cette influence, dans les cas où elle existe, car elle n'existe pas toujours, doit être

extrêmement restreinte, et son rôle dans le phénomène de Wassermann doit être des plus insignifiants.

D'ailleurs, l'expérience *in vitro* montre que la cytase de cobaye, c'est-à-dire le sérum normal, non chauffé, n'est nullement bactéricide pour le bacille d'Eberth : ce dernier y pousse aussi bien que dans du bouillon ordinaire.

Voici encore une autre expérience qui parle dans le même sens.

Préparons un mélange composé de 3 c. c. de sérum normal (cytase) de cobaye et d'une demi-culture de typhique[1]; ce sont là les mêmes proportions que nous avons employées pour l'expérience de M. Wassermann; injectons de suite ce mélange dans la cavité péritonéale d'un cobaye normal, sans addition de sérum anticytasique; le lendemain nous trouverons ce cobaye mort, comme si le sérum de cobaye n'avait pas été ajouté. Ceci prouve que la cytase de cobaye, présentée ici sous forme de 3 c. c. de sérum, et la cytase naturelle que possède déjà le cobaye, réunies ensemble, sont tout de même incapables d'arrêter l'infection.

Ce cobaye meurt donc, bien qu'il possède dans son péritoine beaucoup plus de cytase que n'en avait le cobaye témoin de l'expérience de M. Wassermann, lequel survit à la même dose du bacille typhique.

Il est donc évident que ce n'est pas la cytase qui sauve le cobaye témoin de M. Wassermann et qui intervient dans la lutte contre le typhique; ce n'est pas, par conséquent, l'anticytase qui empêche la lutte contre le bacille typhique et qui fait tort à l'autre cobaye que nous sommes convenu d'appeler anticytasique.

Si ce dernier meurt à la suite d'injection du sérum complexe dont s'est servi M. Wassermann, c'est que ce sérum agit ou bien comme *antiphagocytaire*, ou bien comme *anti-agglutinant*, ou bien comme *précipitant*, ou bien par ces trois propriétés réunies.

Avant de passer à l'étude de ces différentes actions, nous

1. Dans toutes nos expériences, la dose du bacille typhique a été la même et égale à 1/2 culture de 24 heures sur gélose ; la quantité de sérum a été toujours la même : 3 c. c. Une demi-culture du typhique représentait une dose cinq fois mortelle; elle tuait un cobaye de 500 grammes en 18-24 heures. Cette culture provient de la collection de notre collègue, M. Binot, auquel nous sommes heureux d'exprimer ici nos très vifs remerciements.

tenons à faire une remarque au sujet de l'expérience que nous venons de décrire. Pour que l'expérience réussisse, il faut que le mélange du sérum de cobaye et du bacille typhique soit injecté aussitôt fait; car, lorsqu'on laisse séjourner quelque temps ce mélange dans le verre, avant de l'injecter, il peut ne plus tuer; ce n'est pas parce que le sérum de cobaye a eu le temps d'exercer son action bactéricide sur le typhique, mais parce qu'il vient s'ajouter un autre phénomène tout différent, sur lequel nous reviendrons ultérieurement.

Cette réserve faite, passons à l'examen d'une autre propriété du sérum de M. Wassermann, la propriété *anti-agglutinante*.

***

L'agglutination joue un rôle assez considérable dans l'histoire du bacille typhique : nous verrons plus bas qu'un bacille d'Eberth à l'état agglutiné agit différemment d'un bacille d'Eberth non agglutiné. Il était donc tout naturel de nous demander si le sérum, dit anticytasique, serait funeste au cobaye par le fait qu'il empêche le sérum de cobaye d'agglutiner le B. typhique.

Par des expériences appropriées *in vitro*, nous nous sommes assuré que le sérum obtenu par le procédé de Wassermann empêche réellement le sérum de cobaye d'agglutiner le bacille typhique.

Mais, étant donnée la faible quantité d'exsudat contenu dans le péritoine, il était à prévoir que ce pouvoir anti-agglutinant ne devait pas avoir des conséquences importantes au point de vue de l'immunité.

En effet, lorsqu'on examine comparativement les exsudats des deux cobayes, témoin et anticytasique, on constate, comme nous l'avons noté, en passant, plus haut, que dans l'exsudat du cobaye anticytasique il y a moins d'amas de microbes agglutinés que dans celui du cobaye témoin : mais cette différence, bien que très nette et même plus nette que l'action bactéricide, cytasique, n'est pas cependant assez profonde pour pouvoir causer à elle seule la mort du cobaye anticytasique.

***

Il nous reste à examiner la propriété *précipitante* et la pro-

priété *antileucocytaire* du sérum de M. Wassermann. Ces deux propriétés, bien que dirigées contre des éléments différents du sang, contribuent cependant au même but, qui est d'empêcher l'action phagocytaire.

Lorsqu'on fait un mélange *in vitro* de sérum de cobaye normal avec du sérum d'un lapin, qui a été injecté plusieurs fois avec du sérum de cobaye, on voit se produire un précipité granuleux et assez abondant : ce phénomène, décrit pour la première fois par M. Tchistowitch, peut être plus ou moins prononcé pour des raisons qui nous échappent encore.

Le même phénomène se produit *in vivo*, dans le péritoine du cobaye auquel on vient injecter du sérum de lapin préparé comme il a été indiqué.

Dès que ce précipité apparaît, il commence par emprisonner les leucocytes dans la masse de ses fines granulations; il empêche naturellement les leucocytes de se mouvoir librement, et paralyse ainsi jusqu'à un certain degré leur activité phagocytaire.

Mais cette dernière trouve une entrave autrement importante dans la propriété nettement *antiphagocytaire* du sérum de M. Wassermann.

Ce sérum n'est pas leucotoxique, au sens propre du terme; il ne peut pas dissoudre les globules blancs, étant préalablement chauffé à 60°: mais il reste fortement agglutinant vis-à-vis des leucocytes.

En décrivant l'aspect microscopique de l'exsudat péritonéal du cobaye anticytasique, nous avons attiré l'attention du lecteur précisément sur la présence des paquets de leucocytes accolés les uns aux autres, dont le nombre variait et allait jusqu'à 20, 30, 40 et plus par paquet.

Des leucocytes ainsi agglutinés sont évidemment hors d'état de remplir leurs fonctions phagocytaires.

Mais ce n'est pas encore tout.

A côté de cette action visible, se traduisant pas l'agglutination des leucocytes, le sérum en question exerce, en plus, une action directe, paralysante sur chaque leucocyte, en tant que phagocyte. Cette action que nous ne pouvons pas apprécier à l'œil, puisqu'elle n'amène pas de modifications morphologiques, existe incontestablement; car autrement, comment expliquer

que, chez le cobaye anticytasique, au niveau de l'épiploon, des leucocytes, même isolés, non agglutinés, refusent de phagocyter les microbes qui se trouvent tout à côté d'eux, à la portée de leurs pseudopodes.

Il faut donc que le sérum, en plus de son action mécanique, exerce sur les globules blancs encore une autre action que nous ne pouvons désigner mieux qu'en l'appelant antiphagocytaire.

Il suffit de nous reporter aux phénomènes constatés dans le péritoine des deux cobayes de M. Wassermann, pour voir jusqu'à quel degré cette influence antiphagocytaire est manifeste chez le cobaye anticytasique, et jusqu'à quel point le manque de la phagocytose chez ce dernier contraste avec la phagocytose intense chez le cobaye témoin.

Si donc on avait à faire un choix entre les différents noms à donner au sérum employé dans l'expérience de M. Wassermann, ce n'est pas certainement celui d'anticytasique, mais c'est celui d'antiphagocytaire qui traduirait le mieux le caractère dominant dans l'expérience en question.

*
* *

Il nous reste à dire quelques mots du cobaye témoin qui reçoit un mélange du B. typhique et du sérum (3 c. c.) chauffé de lapin normal.

Ce cobaye, qui reçoit dans l'expérience de M. Wassermann une dose 40 fois mortelle, et dans nos expériences toujours une dose cinq fois mortelle[1], et qui malgré cela reste en bonne santé, n'est pas, évidemment, un témoin banal. M. Wassermann attribue cette résistance à l'action stimulante du sérum normal, injecté en même temps que les microbes ; il ajoute que des phénomènes analogues ont été observés pour d'autres microbes par M. Metchnikoff, Isaeff et Pfeiffer. Je me permettrai de faire à ce sujet une petite rectification.

Les auteurs cités par le savant allemand ont vu en effet qu'un cobaye auquel on injecte dans le péritoine du sérum *normal* d'un autre animal résiste le *lendemain*, c'est-à-dire 24 heures après, à une dose simplement ou plusieurs fois mortelle de microbes (choléra, typhique, etc.)

Or, dans l'expérience de M. Wassermann, il s'agit du sérum

1. La dose mortelle fut 1/40 d'anse.

non normal, mais *chauffé*, injecté non la veille, mais *simultanément* avec les microbes.

Le mécanisme par lequel agissent les sérums, dans les deux cas, peut donc ne pas être le même.

Déjà depuis longtemps notre attention a été attirée sur les propriétés stimulantes des sérums chauffés : ainsi, par exemple, dans des expériences encore inédites sur le charbon, nous avons remarqué qu'en préparant les animaux avec du sérum chauffé, on obtient une résistance beaucoup plus marquée qu'avec le même sérum non chauffé.

Faisons remarquer en passant que ce fait prouve que, dans certains cas, l'absence de l'alexine, ou de la cytase, loin d'être préjudiciable à l'animal, est plutôt utile : et voici pourquoi, pensons-nous : en chauffant le sérum à 55°, nous supprimons la cytase qui exerce une action toxique vis-à-vis des cellules et notamment vis-à-vis des globules blancs et rouges de l'animal qui reçoit l'injection ; quant à la propriété stimulante, inhérente au sérum injecté, le chauffage à 55° la laisse complètement intacte.

Voilà pourquoi un sérum chauffé est préférable au sérum non chauffé, lorsqu'on se propose de stimuler, par une injection faite 24 heures avant, la défense naturelle de l'organisme. Nos expériences à ce sujet n'ont été ni assez nombreuses ni assez variées pour que nous puissions affirmer que ce soit là une règle générale pour tous les microbes ; mais elle est sûrement applicable à un certain nombre d'entre eux (charbon, typhique, coli[1]).

Jusqu'à présent il a été question de l'action du sérum injecté la veille de l'inoculation microbienne. Il a fallu voir comment agit un sérum injecté simultanément avec les microbes.

Les expériences faites à ce sujet avec différents microbes nous ont montré que l'effet stimulant du sérum est d'autant plus faible que l'on se rapproche plus du moment d'inoculation des microbes, mais que cet effet existe encore sûrement dans le cas où l'on injecte simultanément sérum et microbes.

Que le sérum normal du lapin, chauffé, injecté au cobaye témoin dans l'expérience de M. Wassermann, exerce réellement

1. L'action du sérum chauffé vis-à-vis du coli a été constaté par le Dr Petit dans le laboratoire de M. Metchnikoff.

une action stimulante sur les leucocytes, c'est ce qui ressort de la comparaison de l'exsudat de ce cobaye avec celui du cobaye anticytasique. Tandis que chez ce dernier, les leucocytes arrivaient dans le péritoine lentement, en petit nombre, chez le premier, par contre, l'afflux leucocytaire se faisait rapidement et atteignait bientôt un chiffre assez élevé.

Nous avons pensé d'abord que cette différence était due à ce que, dans un cas, l'infection évolue librement, sans entraves, tandis que, dans l'autre, elle est aussitôt jugulée; qu'il y a, en d'autres termes, chimiotaxie positive dans le second, et chimiotaxie négative dans le premier, sous l'inflence du B. typhique.

Or, cette hypothèse est inexacte. Il suffit d'injecter à deux cobayes, au lieu du bacille typhique, de la poudre de carmin mélangée respectivement avec du sérum anticytasique et du sérum normal, tous les deux chauffés, pour constater la même différence au point de vue leucocytaire et quant à la façon dont les leucocytes se conduisent dans les deux cas vis-à-vis du carmin.

Chez le cobaye anticytasique, les grains de carmin se trouvent en majeure partie en dehors des cellules, et cela aussi bien dans le liquide péritonéal qu'au niveau de l'épiploon; chez le cobaye injecté avec du sérum normal, le carmin extracellulaire est l'exception; il est tout entier tantôt englobé à l'intérieur de leucocytes, si les grains sont petits, tantôt entouré de nombreux leucocytes, lorsque les grains sont volumineux; la phagocytose est au maximum au niveau de l'épiploon, tout comme dans le cas des bacilles typhiques.

Il faut donc en conclure que c'est bien aux propriétés mêmes des deux sérums en question qu'est due la différence dans la réaction phagocytaire des deux cobayes de M. Wassermann. Si on injecte en même temps à un troisième cobaye un mélange de carmin et du sérum chauffé d'un cobaye, on voit que la réaction phacocytaire dans le péritoine de ce dernier a été notablement moins prononcée que dans le témoin, injecté du sérum de lapin normal.

Il est donc certain que le sérum normal chauffé de lapin, injecté dans le péritoine du témoin, après avoir été mélangé avec le typhique, agit d'une façon stimulante sur le cobaye et permet

à celui-ci de supporter facilement une dose mortelle et même plusieurs fois mortelle du bacille typhique.

Mais il faut aussi tenir compte de ce fait que la stimulation, dans les cas d'injection simultanée du sérum et des microbes, n'a pas le temps nécessaire pour développer toute son action : elle est nécessairement inférieure à celle qui peut être obtenue après injection du sérum faite la veille; et puisque le cobaye témoin de M. Wassermann est capable de supporter dans ces conditions une dose de culture typhique quarante fois mortelle, cela ne peut pas être exclusivement à la faveur de l'action stimulante du sérum ajouté à la culture, comme le croit M. Wassermann.

Ce qui permet au cobaye témoin de supporter impunément une dose quarante fois mortelle, c'est que le sérum de lapin agit directement sur le B. typhique, et, avant que celui-ci soit injecté dans le péritoine, il est déjà immobilisé et agglutiné dans le verre d'expérience; le bacille typhique arrive dans le péritoine non pas à l'état de microbes libres, mobiles, mais modifié, sous forme d'amas plus ou moins considérables.

Mais s'il en est ainsi, nous dira-t-on, l'agglutination doit intervenir aussi chez l'autre cobaye, l'anticytasique, puisque le sérum anticytasique n'est autre qu'un sérum de lapin, et, comme tel, il doit immobiliser et agglutiner les bacilles typhiques.

Et il les immobilise et les agglutine effectivement.

Mais tandis que le sérum normal de lapin, injecté au témoin, agglutine les bacilles typhiques, puis les fait phagocyter énergiquement grâce à sa stimuline, le sérum anticytasique, par contre, ne fait qu'agglutiner les microbes, puis, en raison de son action antiphagocytaire, s'oppose à ce qu'ils soient englobés. Ce cobaye anticytasique ne peut donc pas bénéficier du fait de l'agglutination, ses leucocytes étant empêchés dans leurs fonctions phagocytaires; tandis que le témoin dont les leucocytes sont excités par le sérum normal profite largement de l'agglutination, et supporte grâce à cela des doses énormes de microbes.

II

Nous avons déjà exposé au commencement de cet article les lignes générales du second mémoire de M. Wassermann, dans

lequel l'auteur émet cette idée qu'il faudrait, pour rendre les sérums bactéricides plus actifs, leur ajouter une cytase appropriée.

Voici l'expérience sur laquelle M. Wassermann base sa thèse :

Il a un sérum antityphique dont 1 m. m. c. préserve le cobaye contre une anse de bacilles typhiques très virulents ; si, au lieu d'une anse, il en injecte trois, il n'arrive pas à sauver le cobaye : quelle que soit la quantité de sérum, le cobaye succombe invariablement à cette dose. Mais, si l'auteur ajoute à son sérum antityphique du sérum normal de bœuf, le cobaye survit à la dose indiquée du bacille typhique.

D'après M. Wassermann, la survie du cobaye est due à ce qu'il a fait intervenir, concurremment avec la sensibilisatrice, ou fixateur, renfermée dans le sérum antityphique, la cytase spécifique, qui est, dans le cas présent, représentée par le sérum normal de bœuf.

Il est à peine besoin d'ajouter que l'auteur s'est assuré que le sérum normal de bœuf, à lui tout seul, est incapable de produire cet effet.

Nous regrettons vivement de n'avoir pas pu reproduire, faute de sérum antityphique, cette expérience sous la forme même que lui a donnée l'auteur ; la précision que ce savant apporte toujours dans ses expériences nous répond de son exactitude absolue.

Du reste, quelques expériences, faites dans un sens un peu différent de celui qui a guidé l'auteur, ne laissent aucun doute sur la réalité du fait très intéressant observé par M. Wassermann. Mais pour ce qui concerne la façon dont l'auteur interprète son expérience, nous nous permettrons de faire des réserves.

M. Wassermann aurait pu cependant facilement entraîner notre conviction et nous faire partager ses idées, en faisant une expérience de contrôle, pourtant très simple.

Puisqu'il veut démontrer que c'est l'addition de *l'alexine* ou de *la cytase* de bœuf au sérum antityphique, qui permet à son cobaye de survivre à trois anses de B. typhique, il n'avait qu'à compléter son expérience par une autre ainsi conçue : au lieu d'ajouter du sérum de bœuf normal, contenant la cytase, il aurait dû essayer d'ajouter du sérum de bœuf chauffé à 55°,

c'est-à-dire du sérum qui ne diffère précisément du premier que par l'absence de la cytase.

Si l'addition du sérum de bœuf, privé de sa cytase, s'était montrée incapable de préserver le cobaye, nous aurions eu la preuve irréfutable que c'est bien la cytase, et pas autre chose, qui sauve l'animal.

Mais tant que cette expérience ne sera pas faite, nous nous permettrons de ne pas partager l'opinion de l'auteur; nous exposerons plus bas certaines raisons de croire que le sérum chauffé de bœuf aurait produit le même effet, dans l'expérience de M. Wassermann, que le sérum non chauffé, si ce n'est encore un effet meilleur.

*
* *

Il y a deux manières de favoriser la phagocytose : on peut exciter directement les globules blancs jusqu'à leur maximum d'activité; on peut aussi mettre à la disposition des phagocytes des microbes plus ou moins atteints dans leur vitalité.

Si un phagocyte est capable d'englober et de digérer un nombre donné de bacilles typhiques, par exemple, lorsque ceux-ci ont leurs mouvements libres, il est tout naturel qu'il soit capable de phagocyter avec succès un nombre supérieur de ces mêmes bacilles typhiques si on leur enlève la mobilité, et avec cela la possibilité de fuir les leucocytes.

C'est ce que l'on observe quand on mélange *in vitro* les bacilles typhiques avec certains sérums normaux chauffés ou non chauffés, et qu'on injecte le mélange dans le péritoine du cobaye.

Lorsqu'on examine en goutte suspendue les bacilles typhiques ayant été en contact avec du sérum, on constate que les bacilles, qui tantôt se déplaçaient librement dans le champ, s'immobilisent en grande partie ; ils s'accolent les uns aux autres, forment des amas de plus en plus gros et finissent par constituer un bloc entier de microbes, qui sont comme figés sur place.

Bref, nous assistons là à un phénomène d'immobilisation, suivie d'agglutination, comparable au point de vue morphologique à celui que déterminent les sérums spécifiques.

Tous les sérums normaux n'agglutinent pas le typhique avec

la même intensité. En prenant pour base la rapidité d'apparition de l'agglutination, on peut construire toute une échelle de sérums de forces agglutinantes croissantes.

Afin d'éliminer l'intervention de la cytase, nous avions l'habitude d'opérer toujours, sauf avis contraire, sur des sérums chauffés à 55°-56°, température à laquelle le pouvoir agglutinant reste généralement intact.

Nous avons eu à notre disposition une dizaine de sérums environ, provenant d'animaux de laboratoire ou de boucherie; or c'est celui de bœuf qui s'est montré le plus agglutinant, ou pour mieux dire, le plus rapidement agglutinant; déjà quelques instants après l'addition de ce sérum à l'émulsion du B. typhique, l'immobilisation et l'agglutination sont bien avancées.

Le sérum chauffé de lapin agglutine aussi rapidement, mais cependant un peu moins que le sérum de bœuf. Le sérum qui dans nos expériences s'est montré le moins doué du pouvoir agglutinant est celui de cobaye, lorsqu'on le chauffait à 58°.

Or, que fait-on lorsqu'on ajoute à une émulsion de bacilles typhiques du sérum chauffé de lapin, par exemple, et que l'on injecte ensuite le mélange dans la cavité péritonéale du cobaye? En injectant ce mélange, on réalise les deux conditions essentielles qui favorisent le travail phagocytaire : par la propriété stimulante du sérum, ce mélange agit sur les leucocytes en leur demandant un surcroît d'activité; en plus, en vertu de l'action du sérum sur les microbes, ce mélange ne contient que des bactéries immobilisées, paralysées, se défendant mal contre les phagocytes.

Il est dès lors clair que le concours de ces deux facteurs fait que le cobaye supporte dans ces conditions des doses énormes de microbes.

Il est difficile de dissocier ces deux facteurs dans un sérum chauffé, et de déterminer la part qui revient à la stimuline et celle qui revient à l'action directe sur les microbes, de ce que nous appellerions volontiers immobilisine.

Seul, ce dernier facteur, de même que l'agglutinine, se prête à un dosage relativement précis et facile. Or en ne tenant compte que du pouvoir immobilisant et agglutinant, nous avons observé que plus il est prononcé, mieux le cobaye supporte des doses considérables du B. typhique.

Ainsi, on obtient toujours d'excellents résultats en injectant au cobaye le mélange du B. typhique (1/2 culture de 24 heures, sur gélose) et du sérum chauffé de lapin (3 c. c.).

Le sérum chauffé de bœuf qui, comme nous venons de le dire, immobilise et agglutine le B. typhique encore plus rapidement, peut donner une survie très notable ou définitive, même si on en injecte 20-25 minutes après que le bacille typhique a été inoculé.

Il en est tout à fait autrement pour le sérum chauffé de cobaye qui, lui, n'agglutine le B. typhique que très tardivement ; le mélange du B. typhique et du sérum chauffé de cobaye, fait dans les mêmes proportions que plus haut, tue le cobaye dans les 24 heures.

Le sérum de cobaye normal, non chauffé, agglutine beaucoup mieux que le même sérum chauffé, mais notablement moins que le sérum chauffé de lapin.

Or, lorsqu'on injecte le mélange du B. typhique avec le sérum non chauffé de cobaye, on obtient des résultats contradictoires à première vue, mais qui en réalité s'expliquent facilement, dès qu'on est prévenu : chaque fois que l'on injecte le mélange en question aussitôt qu'il est préparé, c'est-à-dire avant que l'agglutination ait pu se faire dans le verre, la mort du cobaye est certaine. Mais il suffit de laisser ce même mélange dans le verre d'expérience pendant quelque temps, une demi-heure au plus, pour que ce mélange devienne aussi inoffensif que celui fait avec du sérum de lapin ou de bœuf.

Voici une expérience qui le prouve d'une façon nette : nous mélangeons dans un verre à pied une double dose de sérum normal de cobaye (6 c. c.) avec une double dose de B. typhique (une culture entière); une moitié du contenu du verre est injectée à un cobaye aussitôt que le mélange est fait; l'autre moitié est injectée à un autre cobaye du même poids, après une demi-heure de séjour dans le verre. Le premier cobaye meurt dans les 24 heures; l'autre continue à vivre et se trouve déjà complètement rétabli le lendemain de l'inoculation.

Ce n'est donc pas tant le sérum de tel ou tel autre animal qui intervient dans le fait de la survie du cobaye, que l'état plus ou moins avancé d'agglutination que présentent les bacilles typhiques au moment où ils arrivent dans la cavité péritonéale

du cobaye ; il existe donc deux facteurs, l'action stimulante du sérum et le pouvoir agglutinant, auxquels est due la survie du cobaye.

Le rôle de l'agglutination et de la stimulation dans l'infection typhique peut être démontré encore d'une autre façon.

En soumettant des sérums qui sont naturellement très agglutinants, à un chauffage prolongé, on atténue leur pouvoir agglutinant, de même que leur pouvoir stimulant. Ainsi, quand on chauffe le sérum de lapin à 70° pendant deux heures, on retarde notablement l'apparition de l'agglutination ; eh bien, un sérum de lapin, ainsi chauffé, étant mélangé à la dose ordinaire (1/2 culture) du B. typhique, ne préserve pas l'animal de la mort.

Dans une autre expérience, nous avons chauffé du sérum de bœuf pendant deux nuits consécutives à 56° ; ce sérum, mélangé au B. typhique, s'est montré aussi peu efficace que le sérum chauffé de cobaye.

Il résulte de l'ensemble des faits exposés qu'il existe des rapports directs incontestables entre l'état agglutiné du microbe et le pouvoir stimulant du sérum, d'une part, et la facilité avec laquelle le cobaye supporte l'infection, d'autre part.

Nous ne saurions trop insister sur ce fait que la survie du cobaye est au prix de ces deux facteurs agissant concurremment. L'agglutination seule des microbes est impuissante à assurer la vie du cobaye, si elle n'est pas suivie de réaction phagocytaire.

*
* *

Reportons-nous maintenant à l'expérience de M. Wassermann : lorsqu'il ajoute à son sérum antityphique, qui, à lui seul, est impuissant à préserver le cobaye contre trois anses de B. typhique, encore du sérum normal de bœuf, soit de la *cytase* de bœuf, le cobaye survit.

Après tout ce que nous avons vu au sujet de l'agglutination et de son importance dans l'infection typhique, on peut se demander si le cobaye de M. Wassermann n'aurait pas survécu, après avoir reçu du sérum chauffé de bœuf ; on peut se demander, en d'autres termes, si la survie du cobaye, dans l'expérience de M. Wassermann, est due à la présence de la cytase ou à l'action très agglutinante, vis-à-vis du B. typhique, d'un sérum tel que le sérum de bœuf.

Peut-être le résultat serait-il même plus frappant, si M. Wassermann s'était servi du sérum de bœuf, non alexique, c'est-à-dire chauffé; car le sérum de bœuf normal, non chauffé, comme l'a d'ailleurs très bien vu M. Wassermann, est déjà toxique par lui-même; tandis que le sérum de bœuf chauffé ne l'est pas aux doses employées: il présente, en plus, l'avantage d'avoir un pouvoir agglutinant aussi fort que le sérum non chauffé, et d'exercer une action favorable, stimulante sur le système phagocytaire.

*
* *

CONCLUSIONS :

L'immunité naturelle[1] du cobaye vis-à-vis du B. typhique n'est pas due à l'action bactéricide de sa cytase (alexine).

Le sérum anticytasique possède d'autres propriétés que celle de neutraliser la cytase.

De toutes ces propriétés, c'est celle de paralyser les fonctions phagocytaires qui occupe la première place dans l'expérience de M. Wassermann.

L'immunité naturelle du cobaye vis-à-vis du B. typhique rentre dans les lois générales de la doctrine phagocytaire.

Les sérums chauffés exercent une action stimulante sur l'organisme déjà peu de temps après qu'ils sont injectés.

La plupart des sérums chauffés d'animaux normaux exercent un pouvoir agglutinant sur le B. typhique.

Les bacilles typhiques agglutinés par les sérums normaux sont mieux phagocytés et peuvent être injectés à des doses beaucoup plus élevées que les bacilles non agglutinés; mais les bacilles typhiques, bien que très agglutinés, tuent le cobaye chaque fois que l'on empêche la phagocytose.

La théorie de M. Wassermann sur l'effet de l'addition de cytases à des sérums bactéricides ne semble pas suffisamment démontrée; pour ce qui concerne le B. typhique, le rôle attribué à la cytase serait peut-être dû à l'action fortement agglutinante du sérum de bœuf vis-à-vis de B. typhique.

1. Nous parlons au cours de ce travail de l' « immunité naturelle » chaque fois qu'il s'agit du cobaye témoin qui reçoit du sérum normal de lapin; nous le faisons simplement pour nous conformer à la terminologie de M. Wassermann; en réalité, ce cobaye possède plus que l'immunité naturelle.

En terminant nous voudrions attirer l'attention sur la possibilité de tirer quelque profit en pratique de l'emploi des sérums chauffés.

On sait depuis les travaux de M. Issaeff, de M. Metchnikoff et de ses élèves, que l'injection intrapéritonéale de sérum normal, faite à un cobaye 24 heures avant celle de microbes (choléra, typhique, etc.), peut préserver contre la dose deux fois et même plusieurs fois mortelle de ces microbes. Nous avons vu que le sérum chauffé produit le même effet que le sérum non chauffé, sans en présenter les inconvénients.

M. Metchnikoff s'est demandé déjà depuis longtemps, si on ne pouvait pas faire profiter certaines opérations chirurgicales de l'effet stimulant produit par les sérums normaux, et augmenter de la sorte la résistance naturelle du péritoine humain[1].

Après avoir constaté l'effet stimulant immédiat, déterminé par les sérums chauffés, d'une part, et leur effet agglutinant qui facilite tant le travail phagocytaire, nous nous demandons s'il ne serait pas utile de pratiquer, après chaque intervention portant sur le péritoine, une sorte de lavage de la cavité péritonéale par du sérum chauffé de bœuf ou de cheval. En versant dans le péritoine, après l'opération, une certaine quantité de sérum chauffé à 55°, on pourra pour ainsi dire balayer, par le fait de l'agglutination, les microbes (staphylocoque, par exemple) qui se prêtent à l'agglutination par les sérums normaux, et en même temps on agira directement sur les phagocytes du péritoine en les forçant à donner le maximum de leur pouvoir digestif vis-à-vis des microbes agglutinés et même non agglutinés.

1. Un des élèves de M. Metchnikoff, le docteur R. Petit, fait actuellement des recherches dans cet ordre d'idées.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE L'ORIGINE DE L'ALEXINE DES SÉRUMS NORMAUX

PAR LE Dr OCTAVE GENGOU, DE LIÉGE.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

DEUXIÈME PARTIE.

L'alexine des sérums normaux est-elle un produit de sécrétion des globules blancs?

Après avoir renoncé, à la suite de ses propres recherches, à la théorie purement humorale, M. Buchner accepta l'origine leucocytaire de l'alexine du sérum, mais fit de celle-ci une substance sécrétée par les globules blancs vivants. Tout en ne niant pas, de la sorte, le rôle que M. Metchnikoff fait jouer aux phagocytes, dans la défense de l'organisme, M. Buchner laisse toutefois à l'élément liquide du sang, collecteur de l'alexine leucocytaire, une action prépondérante dans l'immunité ; la phagocytose, dès lors, n'est tout au plus qu'un moyen de défense d'importance égale au pouvoir bactéricide des humeurs. Au contraire, M. Metchnikoff ne peut admettre ce libre passage dans le sang de l'alexine du leucocyte bien vivant; pour lui le plasma sanguin n'est pas bactéricide, et la lutte contre les microbes chez l'animal neuf revient tout entière aux globules blancs.

On a cherché de divers côtés à résoudre ce problème, par des moyens différents, qui tous n'ont fait qu'approcher la question, rendant telle ou telle solution plus ou moins probable, sans avoir jamais apporté la preuve certaine que, tel qu'il circule dans les vaisseaux, le plasma sanguin ne contient pas d'alexine.

1. Voir ces *Annales*, p. 68.

Nissen [1], par exemple, injecta des émulsions microbiennes dans les vaisseaux d'un animal ; les voyant disparaître rapidement du torrent circulatoire, il admit que le sang (ce qui, dans son esprit, signifie la partie liquide du sang, c'est-à-dire le plasma) contenait réellement la substance bactéricide du sérum sanguin. On sait actuellement que, dans cette destruction microbienne, toute l'intervention revient aux leucocytes du sang en circulation et à certaines cellules de l'organisme (Wyssokowicz). D'autres fois, il expérimente *in vitro* sur du sang rendu incoagulable, soit par l'injection préalable de peptone dans les vaisseaux de l'animal (notons qu'on doit parfois injecter jusqu'à 45 c. c. chez un chien), soit en recevant du sang dans une solution de sulfate de magnésium. Tandis que le sang peptonisé est bactéricide, le sang magnésien ne l'est pas ; ce dernier fait s'explique par les observations mêmes de Nissen. En effet, du sérum additionné de sulfate de magnésium perd son pouvoir bactéricide ; d'autre part, Nissen affirme que le sang peptonisé détruit très rapidement les leucocytes ; cette dernière méthode est donc tout à fait impropre à résoudre le problème actuel, puisque le plasma peptonisé pourra n'avoir reçu d'alexine qu'après la mort des leucocytes.

En résumé, ces procédés apportent difficilement des résultats inattaquables. Toutefois, peu après, Buchner et Voit [2] reprirent les injections intravasculaires d'émulsions microbiennes et la peptonisation du sang; leurs conclusions, qui sont analogues à celles de Nissen, ne sont donc pas absolument exemptes de toute critique. Nous en dirons autant des expériences où ces auteurs, broyant du sang *coagulé* de chien, en ensemencent des fragments dans les plaques de gélatine, et concluent par là au pouvoir bactéricide du sang complet.

La même année, Buchner et son élève Orthenberger [3] reprenaient la question ; du sang peptonisé était laissé au repos pendant 3 jours, et le plasma ainsi obtenu était bactéricide ; pendant 3 *jours*, ce plasma est resté en contact avec les leucocytes du sang, évidemment très avariés et par conséquent bien peu identiques à ce qu'ils sont dans les vaisseaux; on ne peut donc savoir par là si le plasma ainsi obtenu était déjà bactéricide lors

1. Nissen, *Zeitschr. für Hygiene*, 1889, n° 6.
2. Buchner et Voit, *Arch. f. Hyg.*, 1890, X.
3. Buchner et Orthenberger, *Idem.*

de la saignée, ou s'il l'est devenu quand les globules blancs ont été altérés.

Cette idée que l'alexine existe normalement dans le plasma sanguin pendant la vie, fut aussi admise par MM. Denys et Kaisin [1]; ces savants, constatant que le pouvoir bactéricide du sang (les auteurs ne disent pas s'il s'agit de sang complet, de sang coagulé ou de sang défibriné) diminue ou disparaît à la suite d'injections intravasculaires de microbes, admirent qu'il devait exister *in vitro* dans le sang, tandis que nous savons aujourd'hui que ces fluctuations du pouvoir germicide du sérum correspondent simplement à des variations identiques du nombre des leucocytes dans le sang.

L'année suivante, MM. Denys et Havet [2] arrivaient à un résultat tout opposé; ces auteurs, filtrant du sang sur papier Joseph, constatent que, chez le chien, le liquide ainsi privé de leucocytes est beaucoup moins bactéricide que le sang complet; cela revient à dire que le plasma du chien n'est pas bactéricide. Notons d'abord que, chez l'homme, MM. Denys et Havet firent une constatation inverse; et ensuite que jamais ils ne parlent de la coagulation des sangs employés, fût-ce même pendant 1 et 2 jours; il est bien évident que ce phénomène a dû se produire à quelque moment de l'expérience, et que l'on ne peut être convaincu que les liquides employés correspondent à ce qu'ils sont dans l'organisme vivant.

D'autre part, nous connaissons actuellement un certain nombre de faits qui, s'ils ne sont pas la démonstration absolue de l'absence d'alexine dans le plasma, permettent toutefois de supposer qu'il en est ainsi. C'est ainsi que M. Metchnikoff [3] chez les animaux vaccinés contre le choléra, M. Salimbeni [4] chez des animaux hypervaccinés contre le choléra, le streptocoque et le bacille diphtérique, ont parfaitement vu que les microbes injectés sous la peau de ces animaux ne meurent nullement, sauf à l'intérieur des leucocytes, ce qui revient à dire que l'alexine n'existe chez l'organisme qu'en eux et nullement dans le liquide des tissus. De même, M. Bordet [5] démontra qu'un œdème obtenu,

1. Denys et Kaisin : *La Cellule*, 1893.
2. Denys et Havet : *La Cellule*, 1894.
3. Metchnikoff : Ces *Annales*, 1895.
4. Salimbeni : *Idem*, 1897.
5. Bordet : Ces *Annales*, 1895.

chez des animaux vaccinés, par ralentissement de la circulation, renferme la sensibilisatrice du choléra, mais non pas l'alexine, puisqu'à lui seul il ne donne pas le phénomène de Pfeiffer. Evidemment, il ne s'agit pas là de plasma sanguin, mais de liquide transsudé hors des vaisseaux, ce qui pourrait modifier la teneur en alexine de ce liquide.

Un autre fait, plus démonstratif encore, est évidemment celui qu'observa M. Cantacuzène [1] en 1897. Il vit que, dans la pulpe de la plume chez l'oie atteinte de spirillose, le microbe causal de l'affection reste parfaitement vivant et très mobile dans le sang non coagulé, alors qu'aussitôt la coagulation survenue, c'est-à-dire aussitôt que le plasma est devenu sérum, le spirillum disparaît rapidement. Il y a donc eu passage dans le sérum d'une substance n'existant pas dans le plasma de l'oie. A côté de ce fait, il en est d'autres bien connus, parmi lesquels je citerai la contradiction qui existe entre le pouvoir bactéricide du sérum de lapin neuf pour le *bacillus anthracis* et la réceptivité de cet animal pour le charbon, ce qui indique bien que le sérum normal ne correspond nullement au sang circulant.

En somme, toutes les tentatives faites jusqu'à présent *in vitro* pour résoudre la question qui nous occupe, ont amené les savants à admettre que le plasma sanguin contient l'alexine, que celle-ci soit ou non d'origine leucocytaire; au contraire, tous ceux qui ont observé les phénomènes dans l'organisme, ne peuvent admettre cette conclusion et se rallient à l'opinion de M. Metchnikoff.

Nous nous sommes proposé de rechercher s'il est possible d'observer *in vitro* quelque différence entre le pouvoir bactéricide du sérum sanguin et celui du plasma.

Préparation du plasma.

Plusieurs moyens se présentent évidemment à l'esprit pour obtenir *in vitro* un liquide analogue ou sensiblement identique au plasma normal. Disons tout de suite que la méthode de M. Delezenne [2], qui permet aisément de se procurer du plasma d'oiseau totalement incoagulable, ne nous a jamais mené à un semblable résultat chez les mammifères, comme M. Delezenne

1. Cantacuzène : Ces *Annales*, 1897.
2. Delezenne : *Arch. de physiolog.*, 1897.

lui-même du reste l'a constaté, et ainsi que nous l'avons dit antérieurement (Bordet et Gengou [1]). Seuls, les produits incorporés au sang, tels que la peptone, le sulfate de magnésium, l'oxalate de potassium, etc., permettent d'obtenir facilement un sang incoagulable qu'on peut centrifuger rapidement, de façon à en récolter le plasma plus ou moins débarrassé de leucocytes. Nous avons vu plus haut les objections que l'on peut faire à l'emploi de la peptone et du sulfate de magnésium; l'oxalate de potassium n'est pas un meilleur moyen, ainsi qu'on peut le voir par l'expérience suivante :

	Bouillon.	Bouillon oxalaté	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Sérum oxalaté non chauffé.	Sérum oxalaté chauffé à 55°.	Plasma oxalaté non chauffé.	Plasma oxalaté chauffé.
I.	16,800	19,400	9,600	12,000	8,360	13,200	12,800	17,200
II.	3,960	19,600	0	4,000	2,860	15,444	7,400	9,900
III.	∞	∞	0	31,200	3,250	∞	32,000	∞
IV.	∞	∞	0	∞	∞	∞	∞	∞

Il s'agit de sérum de lapin ; la quantité d'oxalate de potassium ajoutée était telle que la proportion de ce sel dans le sang était de 1 p. 1,000. Le microbe expérimenté était le vibrion cholérique.

Cette expérience démontre que l'oxalate de potassium, à la dose employée, n'est pas bactéricide pour le choléra (bouillon oxalaté), il détruit en grande partie, comme le sulfate de magnésie, l'alexine du sérum normal (sérum normal oxalaté), de telle sorte qu'on ne peut attribuer aucune signification aux résultats fournis par le plasma oxalaté.

Aussi avons-nous eu recours à une autre méthode, qui consiste d'abord à recevoir le sang dans de petits tubes entourés de glace fondante, et mis aussitôt à la turbine pour en décanter le plus tôt possible le plasma centrifugé. Cette technique, qui nous a donné quelques résultats, a toutefois certains désavantages; la centrifugation du sang nécessitant souvent 1 h. 1/2 à 1 h. 3/4 avant de donner un plasma suffisamment dépourvu de leucocytes, il faut souvent l'interrompre (toutes les 20 ou 30 minutes)

1. Bordet et Gengou, Ces *Annales*, mars 1901.

pour renouveler la glace, de façon à maintenir une température basse, sans quoi le plasma se coagule rapidement, avant qu'on ne l'ait décanté. En outre, cette méthode, quoique non identique à la façon dont Buchner extrayait l'alexine des collections leucocytaires (congélation), s'en rapproche toutefois assez, pour qu'on ait tout lieu de craindre que les globules blancs ne supportent pas toujours sans altération une température de 0° pendant près de 2 heures.

Néanmoins, elle fut par nous employée au début quelques fois; on obtient de la sorte un plasma limpide, pour ainsi dire privé de cellules, qui se coagule très rapidement, dès que sa température s'est un peu relevée.

Dans la suite nous nous sommes servis d'un autre mode de fabrication du plasma, basé sur les anciennes recherches de Freund, et qui consiste à recevoir le sang dans des tubes enduits intérieurement de paraffine. Comme nous avons décrit antérieurement cette méthode en détail [1], nous n'en dirons ici que ce qui intéresse directement le présent travail. Nous avons de la sorte obtenu du plasma qui, chez le lapin et chez le chien, se coagule le plus souvent, en tube paraffiné, 4 à 5 heures après la saignée, mais incomplètement, car le liquide exsudé du caillot ainsi formé, reporté dans des tubes non paraffinés, se coagule encore successivement 2 ou 3 fois. Chez le rat, on doit, pour obtenir du plasma, entourer les tubes paraffinés de glace fondante; on recueille ainsi un liquide qui se coagule instantanément et complètement, en tubes paraffinés, dès qu'on le retire de la glace.

En somme, le plasma ainsi récolté contient une certaine quantité de fibrin-ferment, quantité évidemment inférieure à la totalité de cette substance, mais toutefois très notable, plus encore chez le rat que chez le lapin et le chien. Or ce fibrinferment est d'origine leucocytaire, comme l'alexine, et s'il est vrai que celle-ci ne sort du globule blanc qu'après la mort ou l'altération de ce dernier, on ne peut se défendre de craindre que le leucocyte, pendant les manipulations, n'en laisse aussi exsuder une partie ; on peut donc s'attendre à ce que notre plasma de chien, de lapin et surtout de rat, renferme une certaine quantité d'alexine leucocytaire.

1. Bordet et Gengou, *loc. cit.*

Comme nous l'avons dit plus haut, ces plasmas se coagulent toujours, de telle sorte que le liquide qui s'en écoule lors de la rétraction du caillot, en diffère par l'absence de fibrinogène passé à l'état de fibrine concrète. La méthode permet donc d'obtenir un sérum, mais un sérum formé seulement quand la centrifugation a chassé presque tous les leucocytes ; il s'est donc formé en l'absence de ceux-ci, et si l'alexine ne s'échappe du globule blanc qu'après son altération, le sérum ainsi obtenu n'en contiendra que ce que les manipulations rendent inévitable.

Pour pouvoir comparer avec plus de raison les plasmas que nous avons obtenus avec les sérums des mêmes animaux, le sang destiné à fournir ces derniers fut soumis aux mêmes conditions de température et de milieu (paraffine) que celui dont nous tirions les plasmas. Voyons actuellement si les deux méthodes que nous avons employées, et en particulier la dernière qui nous a servi davantage, n'ont pas l'inconvénient d'altérer ou de détruire la puissance bactéricide des liquides en expérience. Dans ce but, nous avons comparé le pouvoir microbicide du sérum de lapin recueilli dans les conditions habituelles, à celui du sérum du même animal recueilli et formé dans des tubes paraffinés, avec ou sans l'aide d'une basse température.

	CHARBON			CHOLÉRA		
	Sérum normal.	Sér. formé dans la paraffine.	Sér. formé dans la par. et refr.	Sérum normal.	Sér. formé dans la paraffine.	Sér. formé dans la par et refr.
I.	816	792	800	2,204	1,980	2,422
II.	0	0	0	0	0	0
III.	0	0	0	0	0	0

Il en résulte que les manipulations auxquelles a été soumis le sang dans cette expérience, n'ont pas altéré sa puissance microbicide, et qu'elles peuvent être appliquées à la recherche de l'alexine dans le plasma obtenu comme nous l'avons indiqué plus haut.

De son côté, M. Danysz, ainsi que nous l'avons appris par une communication orale, s'occupe également en ce moment de l'étude comparative du pouvoir hémolytique du sérum et du

plasma de plusieurs espèces animales; ses recherches feront l'objet d'une publication ultérieure.

A. — Expériences sur le lapin.

I. — *Sur la bactéridie charbonneuse.*

Plasmas obtenus par la méthode de la glace fondante.

Lapin 1.

	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°	Plasma[1] non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	3,220	4,008	2,903	3,710	4,087
II.	3,800	3,422	2,824	3,788	3,908
III.	∞	0	∞	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

1. Nous désignerons sous le nom de plasma le liquide que donne en se rétractant le plasma obtenu par centrifugation.

Lapin 2.

	SÉRUM NON CHAUFFÉ					PLASMA NON CHAUFFÉ				
	1 anse.	2 anses	4 anses.	6 anses.	1 gtte.	1 anse.	2 anses.	4 anses.	6 anses.	1 gtte.
I.	242	621	1,012	2,207	4,500	228	402	809	1,408	2,700
II.	0	0	0	0	0	1,140	1,520	2,280	4,730	∞
III.	0	0	0	0	0	∞	∞	∞	∞	∞

Plasmas obtenus par la méthode de tubes paraffinés.

	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
LAPIN 3.				
I.	284	308	352	381
II.	21	324		428
III.	0	∞	250,000 environ	∞
IV.	0	∞	∞	∞
LAPIN 4.				
I.	36	44	42	39
II.	10	52	8	21
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 5.				
I.	620	686	584	708
II.	1	598	693	620
III.	0	∞	37,125	∞
LAPIN 6.				
I.	693	670	690	720
II.	10	692	3,564	744
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 7.				
I.	6,250	4,812	5,128	5,308
II.	0	5,240	2,552	5,722
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 8.				
I.	2,720	2,928	2,608	2,510
II.	0	3,087	232	2,409
III.	0	∞	10,430	∞

Lapin 9.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé	Plasma chauffé à 55°.
I.	1,110	889	932	1,008
II.	20	912	408	1,220
III.	0	∞	∞	∞
Lapin 10.				
I.	822	948	849	1,020
II.	0	1,112	212	1,308
III.	0	∞	∞	∞

II. — *Sur le vibrion cholérique.*

Plasma obtenu par la méthode de la glace fondante.

Lapin 1.					
	Bouillon.	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°
I.	2,280	1,012	608	989	1,012
II.	976	0	490	0	188
III.	∞	0	∞	2,423	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

Plasmas obtenus par la méthode des tubes paraffinés.

	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
LAPIN 3.				
I.	12,800	13,100	10,640	9,728
II.	0	15,800	15	9,904
III.	0	∞	24.750	∞
IV.	0	∞	∞	∞
LAPIN 4.				
I.	288	342	321	207
II.	0	381	19	292
III.	0	∞	∞	∞
LAPIN 5.				
I.	5.940	6,020	5,748	7,408
II.	2	18,000	280	9,200
III.	0	∞	∞	∞

III. — *Sur le bactérium coli.*

Plasmas obtenus par la méthode des tubes paraffinés :

	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
LAPIN 4.				
I.	3,020	2,904	2,880	3,402
II.	0	13,208	108	6,020
III.	0	∞	∞	∞

Lapin 7.								
	SÉRUM NON CHAUFFÉ			Sérum ch. à 55°	PLASMA NON CHAUFFÉ			Plasma chauffé à 55°.
	1 goutte.	2 gouttes.	4 gouttes.	1 goutte.	1 goutte.	2 gouttes.	4 gouttes.	
I.	36,288	52,420	102,760	25,222	37,408	50,800	103,620	24,920
II.	14,616	68,914	1,726,000	980,000	441,700	678,600	1,469,800	1,213,000
III.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

IV. — *Sur le bacillus typhosus.*

Lapin 5.				
	Sérum non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°
I.	9,010	8,720	7,910	6,622
II.	0	9,428	230	8,030
III.	0	∞	14,400	∞

Comme on peut s'en rendre compte d'après les tableaux précédents, nous avons beaucoup plus fréquemment trouvé une différence dans le pouvoir bactéricide du sérum et du plasma vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse qu'envers les 3 autres espèces microbiennes dont nous nous sommes servi. Presque toujours, le bacillus typhosus et le bacterium coli résistèrent trop à l'alexine, même du sérum, pour qu'une différence entre es divers milieux soit perceptible : au contraire, dans maintes expériences, le choléra succomba aussi rapidement dans le plasma que dans le sérum, alors que ces liquides, provenant des mêmes animaux, se comportaient très différemment pour la bactéridie charbonneuse (lapin 6, 8, 9, 10).

Craignant une fausse interprétation des faits, nous nous sommes proposé de rechercher si cette différence d'action vis-à-vis de ces deux espèces bactériennes était due simplement à ce que la bactéridie charbonneuse, assez peu sensible à l'alexine

du lapin, se prête suffisamment à une différenciation entre le sérum et le plasma, imperceptible avec le vibrion cholérique trop sensible à cette alexine, ou bien si nous avions affaire à deux substances différentes, l'une agissant sur le charbon et rare dans le plasma, l'autre, l'alexine, agissant sur le vibrion cholérique et présente dans le plasma en circulation.

Nous basant sur la démonstration qu'a faite M. Bordet[1] de l'unité de l'alexine contenue dans le sérum normal de chaque espèce animale, nous avons fait absorber, par des globules de poule sensibilisés, l'alexine d'une certaine quantité de sérum de lapin frais. Ce sérum, privé d'alexine, fut ensuite réparti en 2 tubes, dont l'un reçut une goutte de vibrions cholériques sensibilisés, et l'autre une goutte d'une émulsion charbonneuse. Comme il était aisé de le prévoir, le vibrion, plongé dans ce sérum sans alexine, ne présenta pas le phénomène de Pfeiffer; or la bactéridie charbonneuse se montra, elle aussi, absolument intacte dans ce milieu sans alexine et s'y multiplia. Naturellement, des tubes identiques avaient subi des préparations analogues, avec cette différence que les globules de poule n'avaient pas été sensibilisés et n'avaient, par conséquent, pas fixé l'alexine; dans ces tubes, le choléra subit la transformation granuleuse et la bactéridie charbonneuse y succomba, comme elle l'eût fait dans du sérum non préparé. L'alexine est donc bien la substance qui tue le charbon dans le sérum neuf de lapin, et c'est parce que ce microbe se prête mieux à l'expérience, que nous avons toujours observé avec cette espèce une différence entre le plasma et le sérum.

S'il en est ainsi, on peut conclure que, dans le sang circulant, le plasma du lapin ne contient pas d'alexine, car le pouvoir bactéricide du liquide employé comme plasma dans nos expériences, pouvoir bien inférieur à celui du sérum, doit être imputé à la petite quantité d'alexine qui s'échappe, pendant les les manipulations, des leucocytes souffrants. N'oublions pas, en effet, que notre plasma est loin d'être du plasma vrai, et qu'il n'est qu'un liquide s'écartant, moins que le sérum, du plasma normal.

B. Expériences chez le chien

Le sang de chien, d'une alexine moins puissante que celui

1. Bordet, *Ces Annales*, 1900. Voir aussi le n° de mars 1901.

du lapin, convient mieux que ce dernier à l'étude de l'action du sérum et du plasma sur le vibrion cholérique.

Chien 1. — Plasma obtenu par la méthode de la glace fondante

	Bouillon.	Sérum normal.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma non chauffé.	Plasma chauffé à 55°.
I.	1,609	1,521	2,008	1,772	1,282
II.	1,627	1,282	1,927	1,509	1,325
III.	∞	319	∞	∞	∞
IV.	∞	0	∞	∞	∞

Chien 2. — Plasma obtenu par la méthode des tubes paraffinés.

	CHOLÉRA						VIBRIO METCHNIKOVI					
	Sérum 1 g.	Pl. 1 g.	Sérum 2 g.	Pl. 2 g.	S. 55° 1 g.	Pl 55° 1 g.	Sérum 1 g	Pl. 1 g.	Sérum 2 g.	Pl. 2 g	S. ch. 1 g.	Pl. ch. 1 g.
I.	42,720	35,860	69,420	77,760	30,560	32,420	25,920	31,100	46,656	44,850	22,800	20,896
II.	5	12	4	19	32,000	34,810	3	21	1	17	15,810	14,320
III.	22	78,900	28	155,640	∞	∞	864	102,800	16,176	148,200	∞	∞

Chez le chien comme chez le lapin, l'alexine n'existe donc pas en liberté dans le plasma sanguin.

C. Expériences chez le rat.

Il nous a paru intéressant de rechercher si le plasma de rat présente, vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse, le pouvoir bactéricide si intense que possède le sérum de cette espèce animale. Nous nous sommes adressé dans ce but au rat gris, plutôt qu'au rat blanc, parce que ce dernier donne souvent trop peu de sang pour obtenir, chez le même animal, du sérum et du plasma, et en second lieu parce qu'il nous a paru que chez lui la

préparation du plasma est encore plus difficile que chez le rat gris. N'oublions pas qu'ici nous ne sommes parvenu, par la méthode des tubes paraffinés entourés de glace fondante, qu'à obtenir un plasma excessivement coagulable, partant, très riche en fibrin-ferment et naturellement en principes d'origine leucocytaire. Dans les expériences suivantes, le sérum et le plasma correspondants proviennent toujours du même animal, par exemple le plasma et le sérum froids, etc.

	Sérum non chauffé.	Plasma non chauffé.	Sérum chauffé à 55°.	Plasma chauffé à 55°.	Sérum chauffé à 64°.	Plasma chauffé à 64°.
Expérience 1.						
I.	348	353	374	380	447	432
II.	2	13	0	31,100	∞?	864
III.	0	∞	0	∞	∞	∞
Expérience 2.						
I.	3,190	2,340	4,290	5,410	1,100	2,024
II.	0	86	926	1,312	2,250	4,896
III.	0	∞	46,656	360,000	∞	∞
Expérience 3.						
I.	5,825	3,450	10,368	12,120	6,020	5,838
II.	0	288	52	720	2,321	2,592
III.	0	7,020	6,400	10,800	∞	∞
Expérience 4.						
I.	1,181	1,008	625	648	576	720
II.	0	32	2	84	608	762
III.	0	20,736	0	57,024	∞	∞

En conséquence, malgré la différence considérable que l'on est en droit de supposer entre le plasma vrai et ce que la mé-

thode des tubes paraffinés nous livre comme représentant du plasma, il est très facile de constater que ce dernier est bien moins bactéricide pour la bactéridie charbonneuse que le sérum du même animal. Etant donné la richesse de ce liquide en produits leucocytaires, on peut admettre que le faible pouvoir microbicide qu'il témoigne ne lui appartient pas en propre, mais lui vient des leucocytes avariés pendant les manipulations.

Si l'on compare les liquides chauffés à 55° aux liquides qui n'ont pas subi d'élévation de température, on peut se demander si la différence de prolifération microbienne que l'on y observe, tient à ce que le chauffage à 55° a détruit l'alexine, laissant persister dans les liquides la substance qui tue le charbon, rare dans le plasma, abondante dans le sérum et qui n'est détruite que vers 64°, ou bien s'il s'agit d'un affaiblissement, d'une dégradation d'une seule et même substance, détruite complètement seulement vers 64°. C'est dans ce but que nous avons fait avec le sérum de rat, une expérience identique à celle que nous avons rapportée plus haut, et qui nous a désigné l'alexine du lapin comme l'agent bactéricide du sérum vis-à-vis de la bactéridie charbonneuse. Nous avons simplement remplacé ici le sérum de lapin par le sérum de rat. Quoique moins nets que chez le lapin, les résultats permettent cependant d'admettre qu'il s'agit d'une seule et même substance.

En effet, là où l'alexine fut laissée intacte par les globules de poule non sensibilisés, la bactéridie charbonneuse succomba complètement en 2 heures, de même qu'après ce laps de temps on n'apercevait plus, dans le tube similaire, que quelques rares vibrions cholériques transformés en granules. Au contraire, là où les globules sensibilisés de poule avaient absorbé l'alexine, à côté d'un certain nombre de microbes charbonneux altérés, on en voyait une grande quantité d'intacts ; or, le tube similaire montrait lui aussi, à côté de vibrions cholériques intacts, un assez bon nombre de granules de Pfeiffer. Par conséquent, l'alexine n'avait pas été absorbée complètement par les globules de poule, ce qui explique qu'un certain nombre de bactéridies charbonneuses avaient été touchées par l'alexine restante.

Malgré l'imperfection de cette méthode, que nous avons

choisie parce qu'elle nous a semblé être celle qui, tout en retardant suffisamment la coagulation du sang, en altère le moins les éléments, nous sommes donc arrivé à constater que le sérum, formé aux dépens du plasma privé autant que possible de leucocytes, est infiniment moins riche en alexine, chez le chien et chez le lapin, que le sérum des mêmes animaux, obtenu par coagulation habituelle, c'est-à-dire en présence des globules blancs du sang. Cela nous permet de conclure non seulement que les leucocytes sont bien les producteurs de l'alexine des sérums normaux, mais encore qu'ils la gardent en eux tant que leurs conditions normales de vie dans le liquide sanguin ne sont pas modifiées. Cette donnée cadre du reste parfaitement avec les résultats observés antérieurement par MM. Metchnikoff, Bordet, Salimbeni et Cantacuzène.

De même, chez le rat, la substance si bactéricide du sérum vis-à-vis du bacillus anthracis, et que nous pensons être une alexine, n'existe pas dans le plasma en circulation.

VARIABILITÉ DE L'APTITUDE AGGLUTINATIVE

DU BACILLE D'ÉBERTH

PAR M. E. SACQUÉPÉE

Médecin aide-major de 1re classe,
Chef du laboratoire militaire de bactériologie de Rennes.

Dès le début des recherches sur l'agglutination du bacille typhique par les sérums homologues, on érigea en dogme que l'aptitude agglutinative (ou le degré de sensibilité vis-à-vis des agglutinines) du bacille d'Eberth est toujours sensiblement égale vis-à-vis d'un même sérum. En effet, toute une série d'échantillons, provenant de laboratoires très divers, se montrèrent agglutinables aux mêmes doses limites; les variations individuelles furent très restreintes, et de ceci on pouvait conclure que le taux d'agglutination maxima reste le même, quel que soit l'échantillon d'Eberth mis en expérience.

Ces conclusions furent à peu près partout admises et vérifiées. Cependant, plus tard, on put constater de rares exceptions; les uns déclarant qu'il existe, chez le b. typhique, des bacilles primitivement insensibles au sérum spécifique, mais susceptibles d' « acquérir » à la longue la même aptitude agglutinative que l'Eberth type; d'autres rencontrant des bacilles présentant l'ensemble des attributs de l'Eberth, mais notablement plus agglutinables que ce dernier.

La question posée dans ce travail est la suivante :

L'aptitude agglutinative du bacille d'Eberth est-elle susceptible de subir des variations notables, et, s'il en est ainsi, dans quelles conditions se produisent ces variations.

Deux mots d'abord sur la technique employée. Quand il s'agit de pratiquer un sérodiagnostic, on s'adresse à une culture jeune de 24 heures, en bouillon. Or tout le monde sait que la richesse de cette culture est très variable, pour un même échantillon, suivant les milieux, et surtout pour un même milieu suivant les échantillons de bacilles; richesse que traduit le

trouble plus ou moins prononcé du milieu. Ces variations individuelles peuvent n'avoir pas grande importance dans la pratique courante du séro-diagnostic, parce qu'il importe assez peu que l'on soumette à l'épreuve quelques bacilles de plus ou de moins, vu l'extrême variabilité du pouvoir agglutinant du sérum; encore est-il que, même dans ce cas, une plus grande précision ne serait aucunement nuisible. Mais lorsqu'on veut éprouver l'aptitude agglutinative de bacilles différents, il faut de toute nécessité mettre en présence d'une même dose de sérum une même quantité de bacilles sous un même volume, autrement dit comparer entre elles des cultures *de même densité.*

L'expérience suivante le démontre. Une culture très riche d'Eberth en bouillon (tube A) est additionnée de 5 fois (tube B) et de 10 fois (tube C) son volume de bouillon neuf; après agitation, on prélève des volumes égaux de chaque tube, auxquels on ajoute une égale quantité d'un même sérum; voici le résultat, au bout d'une heure.

Culture.	Sérum 1 p. 150	Sérum 1 p. 300	Sérum 1 p. 500	Sérum 1 p. 1000	Sérum 1 p 2000
Tube A.	Agglutination presque complète.	Aggl. nulle.	Aggl. nulle.	Aggl. nulle.	Aggl. nulle.
Tube B.	Agglutination complète.	Agglutination complète.	Agglutination presque complète.	Agglutination légère.	Aggl. nulle.
Tube C.	Agglutination complète.	Agglutination complète.	Agglutination complète.	Agglutination légère.	Aggl. nulle.

C'est-à-dire que le nombre des bacilles agglutinés est toujours sensiblement le même, quel que soit le volume du liquide : ce nombre est moins élevé cependant lorsque la culture est fortement diluée.

Or très souvent les bacilles isolés des eaux ou de l'organisme se développent moins bien que l'Eberth type : nous entendons par là l'Eberth habitué depuis plusieurs années aux cultures successives sur milieux artificiels. Si l'on ne tient pas

compte de l'expérience précédente, leur aptitude agglutinative sera jugée supérieure à ce qu'elle est en réalité.

Il est donc nécessaire d'obtenir des cultures de même densité. On y arrive en émulsionnant dans l'eau des cultures récentes sur gélose ordinaire, jusqu'à ce que le liquide présente un trouble comparable à un type conventionnel obtenu par l'action du nitrate d'argent sur une solution de NaCl à 0,1 gr. par litre; laisser reposer quelques heures afin de faire déposer les quelques amas persistants.

Le deuxième facteur en expérience, le sérum typhique, est facilement prélevé soit chez l'homme atteint de fièvre typhoïde soit chez le lapin immunisé; ces deux groupes de sérums, d'origine différente, ont toujours été employés concurremment; les résultats relatifs se sont trouvés identiques ou à peu près.

Toutes les mensurations sont faites sous le microscope, comparativement avec l'Eberth type. Afin de mettre mieux en évidence les résultats obtenus, nous désignerons sous le nom de *Rapport d'aptitude agglutinative* (R A) le rapport de la limite maxima d'agglutination d'un bacille en expérience, à la limite maxima d'agglutination de l'Eberth type. Par exemple, une goutte d'un même sérum agglutine l'Eberth type à 1/150 et un Bac. C à 1/10; dans ce cas R A = 10/150 = 0.066.

A priori, et pour parcourir toute la gamme des variations possibles, on peut se demander s'il existe des bacilles typhiques moins agglutinables ou plus agglutinables que l'Eberth type; et la réponse étant affirmative, il y aura lieu de chercher à reproduire artificiellement ces mêmes variations en partant de l'Eberth type.

Nous étudierons donc successivement :

1° Les bacilles typhiques non agglutinables d'emblée;

2° La transformation de l'Eberth type en Eberth non agglutinable;

3° Les bacilles typhiques hyperagglutinables d'emblée;

4° La transformation de l'Eberth type en Eberth hyperagglutinable.

I. — Bacilles typhiques non agglutinables d'emblée.

On rencontre parfois dans les eaux, typhoïgènes ou non, des microbes qui présentent l'ensemble presque complet des attri-

buts de l'Eberth (caractères classiques de morphologie et de coloration des cultures sur milieux ordinaires, développement sur milieux phéniqués à haute température; non fermentation des milieux lactosés; absence d'indol dans les cultures, non accroissement sur milieux vaccinés par l'Eberth, pouvoir pathogène variable chez l'animal) et ne différant de l'Eberth type que par deux caractères : ils sont très peu agglutinés par le sérum des typhiques; leur culture sur pomme de terre est comparable à une glaçure colorée en brun clair ou en brun chocolat. Ce dernier caractère est d'ailleurs à peu près général chez les bacilles typhiques authentiques récemment extraits de l'organisme.

On peut désigner de tels microbes sous le nom de *bacilles éberthiformes*. En voici trois exemples :

1° Bacille rencontré dans les eaux de Castres, notoirement typhoïgènes à l'époque (Bac. C). Ce bacille présente tous les caractères précédemment énumérés; R A = 0,066;

2° Bac. extrait des eaux de Nogent-sur-Marne, eaux qui n'ont jamais été accusées de provoquer la fièvre typhoïde (Bac. N); mêmes caractères, R A = 0,1;

3° Eaux de X. sûrement typhoïgènes (Bac. P); mêmes caractères, R A = 0,15.

Dans l'organisme du typhique, on peut également trouver des microbes identiques à tous les points de vue. Sur 3 rates typhoïdiques prélevées 24 heures *post mortem*, les cultures ont donné uniquement des bacilles dont les caractères sont copiés sur ceux des Bac. C, N et P ; un quatrième échantillon, de provenance analogue et de mêmes propriétés, nous a été obligeamment remis par notre excellent camarade Lafforgue.

Dans un cinquième cas, une quantité notable de pulpe splénique put être prélevée 4 heures après la mort; les cultures faites immédiatement donnèrent naissance à l'Eberth classique très agglutinable (Bac. S). Cette pulpe fut conservée telle quelle, à l'abri de toute contamination; après 8 jours, même bacille S très agglutinable; au bout de 15 jours, bacille éberthiforme non agglutinable (Bac. T); R A = 0,15.

En troisième lieu enfin, à côté du coli et de bacilles d'Eberth authentiques, le milieu de Piorkowsky permet d'isoler, dans les selles de typhoïdiques, des microbes identiques aux Bac. C, T,

etc., et en nombre d'autant plus grand, semble-t-il, que la maladie est plus avancée dans son évolution.

Dans le tableau ci-dessous, nous résumons l'origine et les caractères anormaux des éberthiformes étudiés dans la suite.

DÉNOMINATION	PROVENANCE	R. A.	CULTURE S. POMME DE TERRE
Bac. C.	Eaux typhoïgènes.	0.066	Culture colorée peu épaisse.
Bac. P.	—	0.15	—
Bac. N.	Eaux non typhoïgènes.	0.10	—
Bac. A.	Rate typhique.	0.15	—
Bac. B.	—	0.10	—
Bac. F.	—	0.05	—
Bac. L.	—	0.25	—
Bac. T.	—	0.15	—
Bac. E.	Selles de typhoïdques.	0.10	—
Bac. K.	—	0.20	—

Avant de pousser plus loin cette étude, il importe de faire remarquer que la notion classique : tous les bacilles typhiques sont agglutinés de la même manière par un même sérum typhique, comporte un corollaire obligé : tout bacille peu ou pas agglutinable par le sérum typhique, ne saurait être un bacille d'Eberth. La déduction, non formulée au début, l'a été depuis. C'est-à-dire qu'un milieu naturel, souillé par les éberthiformes ici étudiés, à l'exclusion de l'Eberth authentique, ne doit pas être considéré, d'après la doctrine, comme spécifiquement infecté. La question, posée sous ce jour, présente un sérieux intérêt, pour l'hygiène surtout.

Quelle est donc la signification de ces bacilles éberthiformes? leur parenté avec l'Eberth est évidente; reste à savoir si le fossé qui les sépare de ce dernier, le défaut d'aptitude agglutinative, peut être comblé. C'est ce qu'il faut tenter maintenant.

Les premiers éberthiformes ayant été extraits des eaux, on pouvait se demander s'ils ne représentaient pas des bacilles typhiques atténués par un long séjour dans les milieux extérieurs. On fit des passages successifs par l'organisme animal,

sans autre résultat que de fixer davantage les caractères hybrides du début.

La solution devait être donnée par le hasard. Ces bacilles des eaux (C et N) ayant été conservés en tube clos à l'abri de l'air et de la lumière furent repris après six mois. Ils étaient parfaitement vivants; mais leur culture, cette fois, ne différait en rien de celle de l'Eberth type : glaçure incolore sur pomme de terre; surtout, les bacilles C et N étaient exactement aussi agglutinables que l'Eberth type : R A = 1 avec tous les sérums. Le résultat fut exactement le même avec tous les autres éberthiformes, quelle que fût leur origine : eaux, rate, intestin ; conservés en tubes clos, tous devinrent agglutinables au même titre que l'Eberth type après 6, 8 ou 10 mois [1].

D'ailleurs, cette acquisition (ou plutôt, comme nous le verrons, cette récupération) de l'aptitude agglutinative se fait progressivement. Un seul exemple le démontrera, tous les éberthiformes s'étant comportés de façon identique.

Bac. E, extrait de selles typhiques, le 15 mars : à cette époque RA = 0,10 ; conservation en tube clos ; le 10 juin RA = 0,35 ; le 18 août RA = 0,50 ; au 8 octobre, RA = 1. Ultérieurement, l'aptitude agglutinative reste immuable.

Les passages successifs, espacés ou rapprochés sur bouillon ordinaire [1] donnent lieu à la même transformation, en un temps généralement un peu plus long. Les cultures successives sur pomme de terre, milieux lactosés, milieux phéniqués, etc., n'ont aucunement hâté le retour de l'aptitude agglutinative. Le procédé le plus simple est donc en même temps le plus efficace.

Jusqu'ici nous avons laissé dans l'ombre l'action de nos éberthiformes sur l'animal. Ces bacilles sont généralement très pathogènes pour le cobaye, beaucoup plus qu l'Eb. type. Ce fait n'a rien de surprenant, car la plupart de ces microbes provenaient directement de l'organisme et n'étaient pas affaiblis par une longue conservation.

Plus intéressantes sont les propriétés des sérums des animaux inoculés. La réponse s'est toujours montrée la même : le sérum d'animaux inoculés avec les bac. P, B, F, T, K, se montre beaucoup plus actif vis-à-vis de l'Eb. type que vis-à-vis

1. Une transformation du même genre a été également notée par M. Rodet, *Journal de Physiologie et de Pathologie générales*, 1900.

du bac. inoculé ; autrement dit, les propriétés de ces différents sérums sont exactement celles du sérum typhique, et les rapports RA restent les mêmes qu'avec le sérum spécifique.

Citons un exemple : un lapin dont le sérum est inactif à 1 p. 10 vis-à-vis de tous les bac. en expérience, est inoculé avec 4 c. c. de culture stérilisée de bacilles T ; on prélève du sérum 6 jours après l'inoculation ; à ce moment, le sérum agglutine l'Eb. type à 1 p. 550 et n'agglutine qu'à dose bien moindre, soit le bac. T. soit les autres éberthiformes ; et, pour T., on trouve RA = 0,15, exactement comme vis-à-vis du sérum typhique.

Il y a plus : les éberthiformes sont doués d'un pouvoir agglutinogène plus élevé que l'Eb. type. Deux séries de lapins de même âge et de même poids sont inoculés, les premiers avec 4 c. c. de culture stérilisée des bac P, F, B, T ; les autres avec 4 c. c. de culture stérilisée d'Eb. type. Les animaux de la première série fournissent un sérum beaucoup plus agglutinant que ceux de la seconde.

Deux lapins aussi identiques que possible comme âge et comme poids, et dont le sérum n'agglutine aucun bacille à 1 p. 10, sont inoculés avec mêmes quantités de cultures également denses de l'Eb. type (lapin A) et de bac. T (lapin B); après 8 jours, le sérum B agglutine l'Eb. type à 1 p. 550 ; le sérum A à 1 p. 250 seulement.

De telle sorte qu'à considérer seulement les deux termes extrêmes de la série : Eb. type très agglutinable et bac. éberthiforme, on pourrait émettre ce paradoxe que ces microbes sont d'autant plus agglutinables que leur pouvoir agglutinogène est moindre. Une opinion semblable a déjà été émise, quand on est venu avancer que l'Eberth est d'autant moins agglutinable qu'il est plus virulent. D'ailleurs ces deux formules sont toutes deux inexactes, car nous verrons plus tard qu'il existe des bacilles à la fois hyperagglutinables et hyperagglutinogènes ; et, dans les exemples ci-dessus rapportés, l'exagération du pouvoir agglutinogène est due à ce que les éberthiformes récemment extraits de l'organisme animal sont au maximum de leur virulence.

En résumé, on peut rencontrer dans les eaux ou chez les typhiques des bacilles présentant l'ensemble complet des caractères connus des bacilles d'Eberth, sauf deux : absence ou énorme réduction de l'aptitude agglutinative, et coloration de la culture sur pomme de terre. Le sérum des animaux inoculés à

l'aide de ces microbes présente les propriétés du sérum typhique ; et ces mêmes microbes conservés pendant quelques mois reprennent tous les caractères de l'Eberth, y compris l'aptitude agglutinative et l'aspect des cultures sur pommes de terre.

II — Reproduction expérimentale de bacilles éberthiformes.

Il a déjà été dit que les éberthiformes se rencontrent couramment chez les typhoïdiques, à une période avancée de la maladie. Au groupe précédent s'ajoutent les éberthiformes rencontrés dans les eaux ; l'identité parfaite de leurs caractères originels, de leurs transformations ultérieures et de leurs réactions pathogènes, invite à penser que ce deuxième groupe reconnaît la même provenance que le premier : ils sont en relation avec une souillure accidentelle des eaux par des produits émanés de typhiques.

Cette constatation ne laisse le choix qu'à deux hypothèses. Les éberthiformes représentent, ou bien un stade d'évolution d'un microbe de type différent, le coli, vers le type Eberth ; ou bien une forme modifiée du bacille typhique. Dans l'une ou l'autre alternative, la transformation s'opère dans l'organisme typhoïdique.

Soumise au contrôle expérimental, la première conception ne semble pas répondre à la réalité des faits. Trois échantillons de coli intestinal, maintenus pendant des mois (en sacs de collodion) au contact d'organismes fortement immunisés contre le bacille d'Eb., ont conservé intégralement tous leurs caractères ; il ne s'est manifesté aucune modification susceptible de faire admettre quelque acheminement vers le type Eb. Bien entendu, nous n'affirmons nullement que la chose soit impossible : elle ne se produit pas dans les conditions indiquées.

Reste à vérifier la seconde hypothèse ; les éberthiformes représentent une forme modifiée de l'Eberth. On immunise fortement des rats blancs contre le bac. typhique par injections de cultures stérilisées, répétées au cours de plusieurs mois : dans le péritoine d'animaux ainsi préparés, on laisse végéter l'Eb. type pendant longtemps, inclus dans des sacs de collodion. Dans ces conditions, l'Eb. perd peu à peu son aptitude agglutinative, et finalement se comporte comme les éberthiformes ; en même

temps la culture sur pomme de terre devient plus colorée, mais à peine plus abondante. L'expérience répétée trois fois (elle est longue et pénible) a toujours donné le même résultat.

Un seul exemple suffit à la démonstration. Les sacs sont toujours placés dans le péritoine de rats solidement immunisés.

Eb. type : RA = 1 (par définition) mis en sac pendant 3 semaines ; après ce temps RA = 0,85.

2e Sac avec le bacille du sac précédent ; après un mois RA = 0,66.

3e Sac avec le bacille du deuxième ; après un mois RA = 0,35.

4e Sac avec le bacille du troisième ; après un mois RA = 0,20.

5e Sac avec le bacille du quatrième ; après un mois RA = 0,15.

Ainsi donc, l'Eberth type maintenu au contact de l'organisme immunisé, perd peu à peu son attitude agglutinative. Mais il importe de faire remarquer que la transformation s'opère lentement ; il a fallu cinq mois pour atteindre le but. Soulignons en même temps que les conditions de l'expérience, bien qu'assez rapprochées de ce qui doit se passer chez le typhique, restent néanmoins très artificielles. Pour perméable qu'elle soit, la membrane de collodion ne saurait être assimilée à un tissu vivant ; en outre le péritoine ne représente nullement chez l'animal le foyer infectieux qu'est manifestement la rate chez l'homme. Il y aura lieu plus loin de le rappeler.

Reproduite *in vitro*, l'expérience précédente donne moins de résultats. Maintenu pendant longtemps (45 jours) au contact d'une grande quantité de sérum typhique (5 gouttes de culture pour 15 de sérum), l'Eb. conserve le même degré d'aptitude agglutinative. Par contre, cette dernière peut être légèrement abaissée si à une même culture d'Eberth on ajoute plusieurs fois de suite une quantité suffisante de sérum agglutinant.

On fait une culture de l'Eb. type en bouillon ; après 24 heures on ajoute le dixième de son volume d'un sérum stérile actif à 1 p. 250 : même opération deux fois de suite de deux en deux jours : puis repiquage en bouillon ; cette deuxième culture est traitée comme la première ; enfin troisième culture en bouillon additionnée quatre fois, en dix jours, de sérum typhique : au total dix additions successives de sérum. Après ce temps, une culture issue du 3e tube donne RA = 0,75.

Le résultat est beaucoup moins net qu'après le séjour du même Eberth au contact de l'organisme. Sans doute faut-il incriminer les échanges continuels qui se passent dans le péri-

toine, et peut-être aussi l'influence plus active des toxines à l'état naissant.

Le séjour prolongé de l'Eberth dans les cultures additionnées de substances chimiques douées de pouvoir agglutinant (Safranine) n'a pas amené de modification notable au point de vue de l'agglutination.

Il est nécessaire maintenant de mettre en regard les uns des autres les faits précédemment acquis. D'une part, les éberthiformes se comportent vis-à-vis des animaux exactement comme l'Eberth et se transforment spontanément en bac. typhiques authentiques ; d'autre part, l'Eberth peut être artificiellement ramené au type éberthiforme. Le non-agglutinable devient agglutinable, l'agglutinable devient non-agglutinable. Il est dès lors infiniment probable que les éberthiformes rencontrés dans la nature, reconnaissent la même origine que les éberthiformes artificiellement reproduits ; les uns et les autres sont l'expression d'une modification biologique du bacille typhique au contact de l'organisme infecté ou immunisé (ce qui n'implique aucunement que les éberthiformes ne puissent relever d'une autre étiologie actuellement inconnue).

La seule objection que l'on puisse faire à cette manière de voir, c'est que la transformation doit s'opérer très vite au cours de la fièvre typhoïde humaine, alors qu'elle se produit très lentement dans les conditions expérimentales; mais ces dernières conditions sont tout artificielles, on l'a dit plus haut; le sac de collodion n'est pas la rate, l'organisme du rat n'est pas celui de l'homme, et nous ne voyons guère de moyen pratique de répéter l'expérience telle qu'elle devrait être idéalement faite.

Nous accepterons donc que l'éberthiforme n'est qu'une modification de l'Eberth ; modification d'ailleurs temporaire et reconnaissable, grâce à la persistance du pouvoir agglutinogène.

Reste maintenant à interpréter les faits. Dans l'état actuel de nos connaissances générales sur la biologie des microbes, une seule interprétation semble plausible ; l'éberthiforme représente un Eberth accoutumé au contact des agglutinines; sa transformation n'est qu'un phénomène d'accoutumance. Sans cesse baigné par des humeurs agglutinogènes, l'Eberth réagit, se laisse de moins en moins influencer par elles, jusqu'à ce

qu'elles arrivent à peine à l'impressionner; à ce moment, le type éberthiforme se trouve réalisé.

Inversement, ce même Eberth accoutumé aux agglutinines, laissé pendant longtemps en dehors de l'organisme sur milieux artificiels, perd progressivement l'accoutumance qu'il avait acquise, chacune des générations successives en abandonnant une part. Il redevient agglutinable et réalise le type de l'Eberth classique, c'est-à-dire l'Eberth habitué aux milieux artificiels. Mais cette transformation *in vitro* ne consiste pas dans l'apparition, dans l'acquisition d'une propriété nouvelle; c'est au contraire la disparition d'une faculté acquise, de l'accoutumance.

On comprend encore facilement pourquoi l'éberthiforme non agglutinable conserve néanmoins son pouvoir agglutinogène. L'agglutination n'exprimant qu'une réaction de l'organisme vis-à-vis de l'infection éberthienne, l'éberthiforme suscite la production des agglutinines parce qu'il est virulent et souvent très virulent, mais le sérum produit ne l'influence pas, parce qu'il est habitué à ne plus souffrir de son contact.

III. — BACILLES TYPHIQUES HYPERAGGLUTINABLES D'EMBLÉE

Les bacilles de ce genre ont déjà été signalés. On a même écrit que l'Eberth type pouvait être de moitié moins agglutinable que certains bacilles prélevés chez le typhique. Le fait est possible ; mais n'ayant pu constater jusqu'ici de différences aussi considérables, nous sommes tenté de croire qu'il s'est glissé une erreur de technique : l'Eb. pris pour type étant peu agglutinable, ou bien plutôt la culture du bacille en expérience étant moins luxuriante que celle de l'Eb. type (fait fréquent chez les bac. typhiques récemment extraits de l'organisme).

Dans une pulpe splénique extraite 4 heures *post mortem*, on trouva un bacille (Bac. S, voir plus haut) présentant tous les caractères connus de l'Eberth sauf deux : légère coloration des cultures sur pomme de terre : exagération peu marquée de l'aptitude agglutinative, RA = 1.25. On voit que la différence est minime : cette variation en plus, et nous n'en avons qu'un exemple, ne rappelle en rien les variations en moins étudiées déjà. D'ailleurs après quelques cultures on trouve RA = 1.

Par inoculation à l'animal, ce Bac. S se comporte comme l'Eb., le sérum obtenu est identique au sérum typhique ; avec Eb. type : RA = 1 ; avec Eb. S, RA = 1, 25. Comparé à celui de l'Eb. type, le pouvoir agglutinogène du Bac. S est beaucoup plus élevé, il est par contre sensiblement égal (un peu supérieur) à celui de l'Eb. T, non agglutinable, provenant de la même rate.

V. — TRANSFORMATION DE L'EBERTH TYPE EN EBERTH HYPERAGGLUTINABLE

Une telle transformation ne se produit que d'une manière irrégulière. Un Eberth type mis en sac pendant 15 jours sur un animal à peine immunisé, présente une légère augmentation de l'aptitude agglutinative, RA = 1.20. Différence légère, à peine appréciable et d'ailleurs passagère.

CONCLUSIONS

L'aptitude agglutinative du bacille d'Eberth est variable ; on peut rencontrer des bacilles plus ou moins agglutinables que l'Eberth type.

Les variations en plus sont légères et fugaces.

Beaucoup plus importantes sont les variations en moins. On rencontre en effet dans la nature, rarement dans les eaux, couramment chez les typhiques, des bacilles répondant exactement au type Eberth, mais qui sont peu ou pas agglutinés par le sérum typhique (bacilles éberthiformes). Ces microbes se comportent comme l'Eberth vis-à-vis de l'animal ; les sérums éberthiformes présentent les propriétés du sérum typhique. Conservés en tube clos, les éberthiformes se transforment spontanément en bacilles typhiques authentiques, très agglutinables.

D'un autre côté, l'Eberth. type, maintenu pendant longtemps au contact d'un organisme immunisé, se laisse de moins en moins agglutiner par le sérum, et finalement se comporte exactement comme les éberthiformes.

Cette double expérience inverse autorise à conclure que les éberthiformes représentent une forme de bacille d'Eberth, modifié par un long séjour dans un organisme infecté ou immunisé. Cette modification n'est qu'un phénomène d'accoutumance.

INFECTION SECONDAIRE PAR LE B. MESENTERICUS
AU COURS DE LA FIÈVRE TYPHOIDE

PAR Mr E. SACQUÉPÉE.

Médecin aide-major de 1re Classe,
Chef du laboratoire militaire de Bactériologie de Rennes.

Saprophyte banal, le *b. mesentericus* fait partie de la flore bactérienne si variée de l'intestin, à l'état normal comme à l'état pathologique. Sa présence fréquente en ce milieu, l'insensibilité de l'animal à son égard, l'absence de toute connexion apparente avec les états morbides de l'organisme humain, l'ont fait considérer jusqu'à présent comme un hôte au moins inoffensif, et peut-être utile à la digestion.

Expérimentalement cependant, M. Vincent[1] est parvenu à rendre pathogène pour l'animal cette bactérie ordinairement si bien supportée par lui sans dommage apparent. Par des passages successifs chez le cobaye, le mésentericus s'accoutume à ce milieu inhospitalier, s'y cultive, et finalement triomphe de sa résistance, et va jusqu'à tuer les animaux inoculés.

Chez l'homme, pareille virulence n'a guère été signalée. Cependant, à la faveur d'une infection préalable, le mesentericus peut franchir la barrière intestinale, envahir l'organisme pour son propre compte, et déterminer des symptômes qui paraissent bien liés à sa présence. On en jugera par les deux observations suivantes.

OBS. I. — Fièvre typhoïde, accès intermittents ; pneumonie ; guérison. — S..., 23 ans. L'affection débute par céphalée, épistaxis, insomnie, diarrhée.

Entré à l'hôpital le 8e jour ; à ce moment taches rosées, langue rôtie, météorisme abdominal, inappétence, diarrhée, prostration, légère stupeur, céphalée, insomnie, tuméfaction de la rate, fièvre élevée (voir la courbe ci-dessous) séro-diagnostic positif ; diazo-réaction manifeste.

Traitement classique : régime lacté, bains froids, antiseptiques intestinaux.

Evolution banale jusqu'au 19e jour. A cette date apparaissent des accès

1. Aptitudes pathogènes des Saprophytes. Ces *Annales*. 1898, p. 785.

franchement intermittents, durant trois à six heures, caractérisés par les stades classiques : frissons, chaleur, sueurs. Mêmes accès les jours suivants. Les écarts de température sont considérables, comme l'indique la courbe. (Ecart maximum le 25e jour, de 35°8 à 8 heures du matin, à 41°6 à 3 heures du soir.)

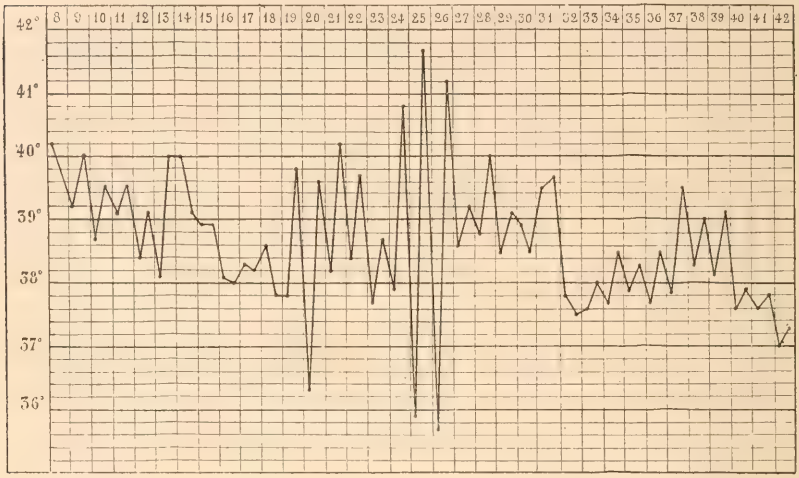


Fig. 1.

Examen du sang quatre fois de suite, avant et pendant l'accès : il n'y a pas d'hématozoaires ; le sujet n'a jamais eu de fièvres intermittentes. Le sang, extrait de la veine le 23e jour, donne en culture du mesentericus modifié, étudié plus loin.

Au 26e jour, apparition d'un foyer de pneumonie franche. Dans les crachats à l'examen direct, pneumocoque, long bacille prenant le Gram ; pas de bacilles décolorés par le Gram. Les mêmes crachats inoculés au lapin tuent l'animal par septicémie pneumococcique ; en culture ils donnent le même microbe que le sang de la veine, mesentericus modifié. La pneumonie se résout péniblement. Convalescence traînante et finalement guérison.

OBS. II. — Fièvre typhoïde ataxo-adynamique, avec accès intermittents irréguliers ; guérison.

C..., 22 ans. Début par céphalée, épistaxis et insomnie : diarrhée au 3e jour.

Entrée à l'hôpital le 4e jour ; à ce moment : langue sèche, tympanisme abdominal, inappétence, diarrhée, tuméfaction de la rate, prostration : insomnie. Diazo-réaction intense ; séro-diagnostic négatif.

Au 9e jour, taches rosées ; au 10e, séro-diagnostic positif.

Traitement classique : lait, bains froids, naphtol.

Évolution sévère sous la forme ataxo-adynamique.

A partir du 18e jour, surviennent des accès intermittents irréguliers

revenant tous les deux ou trois jours, avec 3 ou 6 heures de durée, toujours l'après-midi : frissons et chaleur intenses, sueurs peu abondantes.

L'examen répété du sang ne révèle pas d'hématozoaires ; le sujet n'est pas paludéen.

La culture du sang prélevé dans la veine donne un mesentericus modifié, étudié ci-dessous.

Après le 27e jour, l'affection continue son évolution ordinaire et se termine par la guérison.

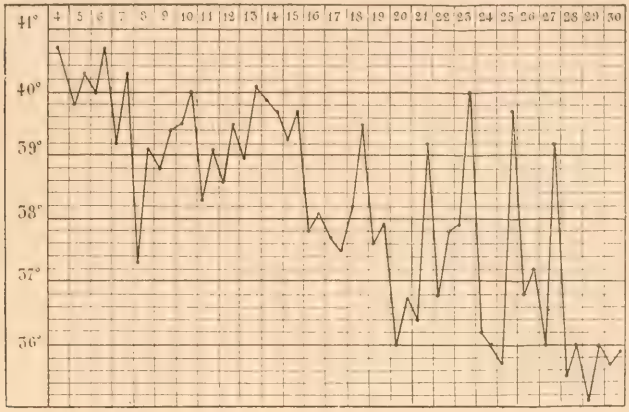


Fig. 2.

En résumé, un *mesentericus modifié* a pu être rencontré chez deux typhiques, dans le sang chez l'un, dans le sang et les crachats chez l'autre. Ces deux malades n'avaient d'autre particularité commune que la modification de l'évolution normale de la dothienentérie par les accès intermittents : ces accès manquaient totalement chez vingt autres typhiques du service ; et le sang examiné chez onze d'entre eux, mis en culture, ne renfermait pas de microbes.

Provenant de S... ou de C... le *mesentericus* modifié s'est comporté de façon à peu près identique en dehors de l'organisme.

En première culture, le bouillon se trouble uniformément, fortement, avec voile léger à la surface ; sur gélose, couche peu épaisse, blanc grisâtre, bleutée, dépassant de 3 ou 4 millimètres la strie d'inoculation : sur pomme de terre, coloration brun-jaunâtre sur toute la surface du milieu, avec culture peu abondante, en glaçure chez C... ; plus épaisse chez S... : ajoutons à cela que le sérum des deux malades agglutine fortement ce microbe à 1 pour 50. L'ensemble de ces caractères fait

penser au coli ou à l'Eberth ; mais le bacille est long, épais, prend le Gram et forme des spores après 6 ou 8 jours de culture, ce n'est donc ni l'Eberth ni le coli.

Dans les cultures successives, l'aspect se modifie rapidement. Le 3e passage sur pomme de terre laisse voir déjà quelques petites crêtes saillantes à la partie supérieure du milieu, légèrement desséchée.

Progressivement, chaque génération nouvelle modifie les caractères primitifs, et dès le huitième passage la modification est complète et persistante. Dès lors, le bouillon est à peine troublé dans la profondeur ; la culture se fait presque exclusivement à la surface, sous forme d'un voile ridé, se reformant sitôt détruit ; la surface de la gélose est envahie tout entière par une culture opaque, hérissée de plis fortement saillants ; sur pomme de terre, développement exubérant, gaufrage régulier marqué de crêtes hautes et épaisses, toujours colorées en brun. Au microscope enfin, même bacille long prenant le Gram ; mais cette fois, les spores se forment très vite, dès les premiers jours. C'est l'aspect classique du *mesentericus*.

Avant d'aller plus loin, il est intéressant de constater que les caractères du *mesentericus* sortant de l'organisme étaient à peu près identiques à ceux que signale M. Vincent à la suite de passages répétés chez le cobaye.

Franchement agglutinées à 1 pour 50 par le sérum des deux malades précédents, les cultures primitives n'étaient aucunement modifiées par le sérum d'autres typhiques à la dose de 1 pour 15.

Inoculé à l'animal, même en quantité assez considérable, (3 c. c. dans le péritoine du cobaye), le *mesentericus* modifié ne le tue pas ; mais il provoque une forte élévation thermique. Le bacille est activement englobé par les phagocytes ; en sacrifiant l'animal après quelques jours, on a toujours constaté des lésions en foyer : abcès du mésentère, péritonite localisée ; dans le pus, on retrouve le bacille libre, vivant, très abondant. Par association avec un Eberth fortement atténué, on ne constate pas d'exaltation marquée de la virulence.

En résumé, on peut rencontrer chez certains typhoïdiques un bacille méconnaissable dans ses premiers développements sur milieux artificiels, mais susceptible de modifier rapidement

ses caractères primitifs, jusqu'à revêtir l'aspect du *mesentericus*, et qui est un *mesentericus* modifié : les cultures successives lui permettent de retrouver son type ancestral.

Quel a été son rôle dans la maladie ? Le sang puisé chez onze typhiques, d'évolution banale, n'a rien donné en culture ; au contraire, le sang prélevé chez deux typhiques présentant des accès intermittents, au cours de ces accès, renfermait un *mesentericus* modifié agglutiné par le sérum des mêmes sujets. En présence de cette constatation, il est bien difficile de se résoudre à admettre qu'il y ait là une simple coïncidence de hasard; il est plus conforme à la logique d'accepter que le *mesentericus* est venu ajouter son appoint à l'infection typhoïdique, et, greffant ses effets sur les réactions dues à l'Eberth, réaliser un syndrome tout spécial et dès longtemps décrit. Ceci ne veut pas dire que dans d'autres cas analogues, on ne puisse mettre en cause des microbes tout différents ; un syndrome uniforme peut traduire mille impressions diverses.

L'absence ou le faible degré du pouvoir pathogène pour l'animal prouve simplement qu'un microbe peut être virulent chez l'homme et inoffensif chez les animaux de laboratoire, fait depuis longtemps connu.

Il est donc évident qu'un saprophyte banal, le *mesentericus*, est capable d'évoluer pour son propre compte dans le milieu humain à la faveur d'une autre infection plus virulente. D'où vient ce *mesentericus?* Probablement de l'intestin qu'il peut franchir à travers de larges ulcérations. Le fait est d'autant plus probable que, dans les diarrhées saisonnières de l'été dernier, nous avons constaté dans les selles une pullulation excessive de ce même microbe ; et l'épidémie de fièvre typhoïde ayant succédé immédiatement à ces diarrhées, il y a lieu de penser que le *mesentericus* a pu s'habituer peu à peu au contact de l'organisme, en modifiant tout ensemble ses caractères morphologiques et biologiques. Des passages successifs par l'intestin humain transforment le banal saprophyte en pathogène éventuel : répétition, chez l'homme, d'une expérience vérifiée par avance chez l'animal. Ce n'est là d'ailleurs qu'une hypothèse; d'autres faits sont nécessaires pour lui permettre de prendre corps.

SUR LES PROPRIÉTÉS BACTÉRICIDES DU SÉRUM SANGUIN

DANS LE COURS DES MALADIES

PAR M. LE Dr OSTRIANINE, de KHARKOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les propriétés bactéricides du sang des animaux sains furent constatées pour la première fois par *Fodor*. Il fit cette constatation sur le sang des lapins vis-à-vis des bactéridies charbonneuses. Ces faits ont été confirmés par de nombreuses expériences de *Nuttall*, *Niessen* (1), *Behring* et *Buchner*. Ce dernier démontra que non seulement le sang, mais aussi le sérum sanguin possède cette propriété bactéricide.

Le sang tue les bactéridies, dit Buchner, seulement pendant les premières heures, ensuite il devient un excellent milieu de culture pour elles, grâce à la destruction des globules sanguins.

Cette propriété bactéricide du sérum a été attribuée par Buchner à une substance, qu'il désigna sous le nom d'*alexine*.

Nuttall et plus tard Buchner trouvèrent que la propriété bactéricide du sérum disparaît si l'on porte ce dernier à 55°.

Flügge et *Buchner* créèrent la théorie humorale de l'immunité. D'après cette théorie, ce seraient les alexines qui protégeraient l'organisme contre l'infection. Ces auteurs supposaient que ces bactéries circulant dans le sang rencontraient les alexines qui les détruisaient.

Dans ces derniers temps, Buchner (2) abandonna sa théorie de l'immunité purement humorale. D'après lui, c'est seulement dans des cas exceptionnels qu'on pouvait expliquer la défense de l'organisme par les alexines seules, à l'exclusion de l'action des leucocytes.

Les recherches ont mis en évidence un grand nombre de faits qui sont en contradiction avec la théorie qui attribue la défense

de l'organisme à des alexines. Ainsi le lapin, dont le sérum possède un pouvoir bactéricide vis-à-vis les bactéridies du charbon, contracte néanmoins très facilement cette maladie.

Il existe un certain nombre d'autres faits du même genre.

Metchnikoff (4) a émis le premier la supposition que la propriété bactéricide du sérum pourrait bien être d'origine leucocytaire. Buchner présenta de nombreux faits à l'appui de cette hypothèse, et avança l'opinion que les alexines seraient sécrétées par les leucocytes pendant leur vie.

En 1889, Metchnikoff (5) montra que pendant la vie le sang ne possède pas ces substances bactéricides, mais que ces substances se forment hors de l'organisme, *in vitro*, et sont éliminées par les leucocytes au moment de leur destruction.

Bordet (6) confirma ces observations, et démontra la corrélation indubitable qui existe entre la leucocytose d'une part et le pouvoir bactéricide du sérum sanguin de l'autre.

Si l'on admettait la théorie humorale d'après laquelle les alexines seraient les défenseurs de l'organisme contre l'infection, comment expliquer que les animaux possédant à l'état normal des alexines sont très sensibles aux infections, tandis que ceux qui en sont privés sont réfractaires? Evidemment, il aurait fallu expliquer cela dans le premier cas par la diminution et même la disparition des alexines, et dans le second par leur formation. Afin d'éclaircir cette question, beaucoup d'observateurs ont fait un grand nombre de recherches. Les uns trouvèrent que pendant la durée de l'infection les propriétés bactéricides du sérum sanguin diminuaient ou même disparaissaient complètement (*Niessen*, *Lubarsch*, *Székély* et *Szana*, *Bastin*, *Denys* et *Kaïsin*) : d'autres ne constatèrent aucun changement.

Ainsi *Conradi* (12), après avoir injecté des bactéridies charbonneuses, sous la peau ou dans les veines de lapins, trouva que la propriété bactéricide du sérum ne subissait aucun changement ni pendant la première période, c'est-à-dire pendant le processus local, ni pendant la seconde, lorsque le sang contient de nombreuses bactéridies. Il observa les mêmes faits chez le chien.

Cependant, d'après la théorie humorale, on devrait s'attendre à voir, pendant l'infection par le charbon, une diminution de la quantité d'alexines chez les lapins qui contractent facilement cette maladie, et par contre, une augmentation chez les chiens

qui sont réfractaires au charbon. Or, en réalité il n'en est rien! Les expériences de Conradi démontrèrent que les alexines restent sans changement chez les uns comme chez les autres.

La question de l'action des alexines dans le cours des maladies présente cependant un grand intérêt. On pourrait y trouver peut-être l'explication de l'insuccès de l'emploi thérapeutique des sérums bactéricides.

Wassermann consacre à cette étude son travail intitulé : « *Uber neue Versuche auf dem Gebiete der Serumtherapie* » (13).

Les sérums thérapeutiques se divisent en sérums antitoxiques et en sérums bactéricides. Les premiers renferment des substances spécifiques agissant contre les toxines, les seconds n'ont aucune action sur les toxines, mais agissent sur les microbes mêmes, qu'ils tuent et dissolvent.

Les études de Bordet (14), confirmées par les recherches de *Ehrlich* et *Morgenroth* (15), sur le sérum hémolytique, démontrèrent que les actions bactéricide et dissolvante des sérums appartiennent à deux agents distincts : 1) *Immunkörper* d'après Ehrlich ou *substance sensibilisatrice* d'après Bordet et 2) *complément* d'après Ehrlich ou *alexine* d'après Bordet. Cette dernière substance se trouve dans le sérum sanguin de l'animal neuf, tandis que la première se forme pendant l'immunisation ou bien après la guérison.

L'alexine est une sorte de ferment digestif, qui ne peut pas agir sur les bactéries sans le concours de l'autre agent, qui le rend sensible à l'action bactéricide, et sert, pour ainsi dire, de trait d'union entre l'alexine et les bactéries.

Donc, pour que l'emploi des sérums bactéricides puisse être suivi de succès, il faut mettre en présence des quantités suffisantes de substance sensibilisatrice et d'alexines. Si l'un de ces agents n'est pas en quantité suffisante, l'effet thérapeutique n'aura pas lieu.

Wassermann suppose que si les sérums bactéricides échouent, c'est parce que l'organisme malade dépense une grande partie de l'alexine se trouvant normalement dans le sérum, et par conséquent *la substance sensibilisatrice* (*Immunkörper*), introduite en quantité suffisante avec le sérum bactericide, reste sans action, ne trouvant pas d'alexine en quantité nécessaire.

L'organisme malade dépense-t-il réellement toute son alexine qui existe à l'état normal?

Afin de résoudre cette question, j'ai entrepris une série de recherches sur les propriétés bactéricides du sérum sanguin dans le cours de l'infection charbonneuse chez les lapins, du choléra chez les cobayes, et enfin à l'état normal chez les uns et chez les autres.

I

EFFET BACTÉRICIDE DU SÉRUM SANGUIN DES LAPINS SUR LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE A L'ÉTAT NORMAL ET PENDANT L'INFECTION CHARBONNEUSE

Je commençais mes expériences par saigner les lapins sains, et 24 heures après je leur faisais une injection hypodermique de culture virulente de charbon. Cette culture, de 16-18 heures, sur gélose, était mélangée avec 10 c. c. de solution physiologique du sel marin. Chaque injection contenait 1/10 de cette émulsion. La maladie durait, généralement, de 36 à 60 heures.

Je pratiquais la seconde saignée le premier ou le deuxième jour de la maladie, 12-20 heures avant la mort, parfois quelques heures seulement avant, et enfin même pendant l'agonie. Je gardais le sang pendant 24 heures dans la glacière pour laisser déposer le sérum. 1 c. c. de ce sérum était ensemencé avec une anse de fil de platine plongée dans une culture de charbon de 16-18 heures sur gélose.

L'effet bactéricide était étudié au moyen des boîtes de Pétri sur gélose. Le nombre de bactéries ensemencées n'était pas élevé; on en comptait généralement de 200 à 2,000.

Lorsqu'on examine le tableau A, on constate que le sérum des lapins sains possède des propriétés bactéricides incontestables; dans deux expériences cependant (7,12) le sérum n'en avait aucune.

Cette propriété bactéricide était manifeste dans la plupart des expériences, pendant le premier jour seulement; dès le deuxième on voyait déjà des bactéries se développer (4, 11).

L'effet bactéricide du sérum des lapins atteints de charbon a été étudié dans la plupart de mes cas, à la période d'infection très avancée, lorsque le sang charrie de grandes quantités

de bactéries, souvent quelques heures seulement avant la mort, et parfois même pendant l'agonie de l'animal. Je n'ai jamais constaté non seulement la disparition, mais même la diminution de la propriété bactéricide, sauf dans l'expérience 11, qui a été faite avec du sang, et non avec du sérum.

Le sérum des lapins atteints de charbon possède donc un pouvoir bactéricide aussi fort que le sérum normal; chez les premiers cette propriété paraissait même légèrement accrue, ou bien elle se manifestait dans les circonstances, très rares d'ailleurs, où précédemment elle avait fait défaut.

Puisque nous avons jugé de la force bactéricide d'après le nombre des colonies, il a fallu aussi se demander si l'agglutination ne serait pas la cause de la diminution du nombre de colonies? Les expériences 7, 8, 9, 12 démontrent qu'il est impossible de mettre cette diminution exclusivement sur le compte de l'agglutination. Ce n'est que rarement que cette dernière exerce en effet son action. Ainsi, nous voyons, dans les expériences 7 et 8, que le sérum ne possède point au cours de l'infection charbonneuse de propriété agglutinante vis-à-vis des bactéridies, et cependant l'effet bactéricide existe (diminution du nombre de colonies); dans deux autres expériences (9 et 12) l'agglutination se manifeste, mais d'une façon très peu prononcée. On sait que le sérum, chauffé pendant une 1/2 heure à 56°, perd sa propriété bactéricide.

En effet, lorsque nous avons chauffé pendant une 1/2 heure à 56° le sérum des lapins sains, nous avons constaté cette disparition; mais nous n'avons observé rien de pareil avec le sérum pris sur les mêmes lapins après qu'ils ont été inoculés du charbon. Ce fait paraît être contradictoire. Cependant il est facile de l'expliquer. C'est que, lorsqu'on chauffe pendant une 1/2 heure à 56° le sérum des lapins atteints de charbon, ce sérum acquiert une propriété agglutinante assez notable (il agglutine en proportion de 1 : 10). Cette propriété se manifeste habituellement pendant les premières heures qui suivent la préparation du mélange (le sérum étant à l'étuve). Nous avons dit plus haut que le sérum des lapins atteints de charbon possédait quelquefois la propriété agglutinante même sans être chauffé; le chauffage pendant une 1/2 heure à 56° augmente cette propriété. Par conséquent, dans ces cas, c'est l'agglutination qui cause la diminution

du nombre de colonies, comme on aurait pu le supposer, et non la persistance de la propriété bactéricide, malgré le chauffage.

Si l'on chauffe le sérum des lapins atteints de charbon pendant une heure à 65°, la propriété agglutinante ainsi que la propriété bactéricide disparaissent toutes les deux.

L'origine leucocytaire de la propriété bactéricide du sérum résulte des travaux de Metchnikoff et de Bordet. Nos expériences ne font que la confirmer. Nous n'avons jamais constaté, pendant l'infection, ni la diminution de la propriété bactéricide, ni celle du nombre de leucocytes. Lorsqu'on compare le nombre de leucocytes à l'état normal avec celui que l'on constate pendant l'infection par le charbon, on constate, dans la plupart des cas d'infection charbonneuse, une faible augmentation du nombre de leucocytes, ainsi qu'une légère recrudescence de la propriété bactéricide (Exp. 7 et 8).

II

EFFET BACTÉRICIDE DU SÉRUM SANGUIN DES COBAYES SUR LE VIBRION DU CHOLÉRA A L'ÉTAT SAIN ET PENDANT L'INFECTION CHOLÉRIQUE

Ces expériences ont été faites de la même façon que les précédentes.

J'injectais aux animaux, dans la cavité abdominale, une émulsion de culture cholérique de 16-18 heures, sur gélose. Les doses variaient selon la virulence de la culture.

Les expériences ont été faites avec un vibrion de *Nasik*. Cette culture étant trop virulente, tous mes animaux périrent dans un laps de temps trop court pour que je puisse faire des observations. C'est pourquoi dans la suite je me suis servi d'une culture *cholérique* moins virulente (*Prusse orientale*). L'injection de cette dernière culture provoquait un état morbide dont la durée était de 1 à 8 jours. J'injectais les cobayes 24 heures après la première saignée. On n'observait aucun changement dans la leucocytose après cette première saignée.

Dans la première série de six expériences pour lesquelles je me suis servi de la culture du choléra Nasik, la maladie ne durait habituellement que 4-7 heures. Dans deux expériences seulement elle avait duré davantage; dans l'exp. 6 elle dura 48 heures, et dans l'exp. 2, 8 jours.

Lorsque l'évolution de la maladie est rapide, la propriété bactéricide ne subit aucun changement (Exp. 1, 3, 5), sauf dans une seule expérience N° 4, où le sang a été pris pendant l'agonie de l'animal.

La saignée a été faite une demi-heure ou 1 heure avant la mort. Pas de changement non plus dans la leucocytose. Pendant l'agonie (Exp. 4) il y a eu diminution du nombre de leucocytes, ce qui explique la diminution de l'effet bactéricide.

Dans le choléra à évolution plus longue (Exp. 2 et 6), on ne constata pas non plus, ni pendant les premières heures (5 h.), ni à l'apogée de la maladie, de changements dans le pouvoir bactéricide. Le nombre de leucocytes était normal.

Dans la seconde série d'expériences faites avec la culture de *Prusse orientale*, l'évolution de la maladie fut plus lente (de 24 heures à 7 jours) : le pouvoir bactéricide du sérum ne subit aucun changement, même à un stade très avancé de la maladie, lorsqu'on constatait des vibrions dans le sang, et lorsque la température de 38°,7, 38°,5, tombait à 37° et même 34°. Pas de changement non plus au point de vue de la leucocytose.

Dans les cas où la propriété bactéricide faisait défaut à l'état normal, elle manquait aussi pendant la maladie (Exp. 13, 14). Une fois (Exp. 7), où la maladie avait duré 24 heures, on constata pendant l'agonie une diminution de la propriété bactéricide. On observa dans ce cas aussi une diminution du nombre de leucocytes de 8,400 à 5,200.

Dans l'infection cholérique d'une certaine durée, la propriété bactéricide non seulement ne diminue pas, mais même elle augmente légèrement, ainsi qu'on le voit dans l'exp. 8. Dans ce cas la maladie avait duré 7 jours. On n'observa aucun changement dans la propriété bactéricide 19 heures après le début de la maladie, mais on constata une légère recrudescence de cette propriété immédiatement après la mort. Les leucocytes n'ont pas été comptés chez ce cobaye avant sa mort.

Le chauffage pendant une demi-heure à 56° détruit la propriété bactéricide du sérum, chez les cobayes sains aussi bien que chez les cobayes atteints de choléra.

Nous pouvons donc conclure que la propriété bactéricide du sérum des lapins atteints de charbon, aussi bien que celle du sérum des cobayes atteints de choléra, ne s'épuise pas pendant

la maladie, et, en plus qu'elle se trouve en relation avec la leucocytose.

Que M. le professeur Metchnikoff veuille bien agréer l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir indiqué le sujet de mon travail et m'avoir guidé par ses conseils éclairés pendant toutes mes recherches.

BIBLIOGRAPHIE

1) Niessen. *Zeitschrift für Hygiene*, 1889, B. V, p. 487.
2) Buchner. *XIIIe Congrès international de médecine, Paris* 1900, 2-9 août.
3) Metchnikoff. *L'Immunité.*
4) Metchnikoff. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887.
5) Metchnikoff. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889.
6) Bordet. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895. N° 6.
7) Niessen. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1889. B. V.
8) Lubarsch. Cit. Conradi. *Zeitschrift für Hygiene*, 1900, Bd. 34, H° 2.
9) Székely et Szana. *Centralbl. f. Bacteriol.*, 1892, B. XII.
10) Bastin. *La Cellule*, t. VIII, p. 383, 1892.
11) Denys et Kaisin. *La Cellule*, t. IX, p. 337, 1893.
12) Conradi, *Zeitschrift für Hygiene*, 1900, Bd. 34, H° 2.
13) Wassermann. *Deutsche medicin. Wochenschrift*, 1900. N° 18.
14) Bordet. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, t. XII, n° 10; 1899, t. XIII, n° 4.
15) Ehrlich et Morgenroth. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1899, n° 1, n° 22.

EXPERIENCES

Dans les tableaux qui suivent, on a résumé les données et les résultats principaux de chaque expérience.

SNA signifie sérum naturel des animaux sains, non chauffé.
SNI — le même sérum chauffé 30 minutes à 56°.
SMA — sérum des animaux malades, non chauffé.
SMI — le même sérum chauffé 30 minutes à 56°.

TABLEAU A

EFFET BACTÉRICIDE, SUR LA BACTÉRIDIE, DU SÉRUM DE LAPIN NORMAL ET DE LAPIN CHARBONNEUX

Numéro de l'expérience.	Nombre des colonies à diverses époques après l'ensemencement.						Leucocytes av. saignée.		Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	24 h	48 h		Lapin sain.	Lapin malade	Ap. injection.	Avant mort.	
N° 1. SNA	780	68	600	∞						Pendant l'agonie.	45 heures
SNI	840	800	850	∞							
SMA	272	35	»	76	900						
SMI	278	14	»	14	144						
	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	24 h.	48 h.					
N° 2. SNA	343	92	20	10	600	∞	9200	9000	40 heures	9 heures	49 heures
SNI	735	2000	2800	7500	∞	»					
SMA	414	3	»	»	1	∞					
SMI	1400	196	90	96	∞						
	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	24 h.	48 h.					
N° 3. SNA	382	52	104	227	∞		9600	16600	40 heures	4 h. 30′	44 h. 30′
SNI	900	642	2850	11000	∞						
SMA	270	26	10	13	2	∞					
SMI	770	34	6	5	∞						
	0 h.	1 h.	4 h.	6 h.	8 h.	24 h.					
N° 4. SNA	414	390	13	1	4	1270	12000	17200	42 heures	8 heures	50 heures
SNI	372	180	4	2	2	183					
SMA	200	77	40	16	9	∞					
SMI	110	182	1512	3580	∞						
	0 h.	3 h.	4 h.	6 h.	8h.	24 h.					
N° 5. SNA	200	22	9	4	45	∞	8800	9600	42 heures	18 heures	60 heures
SNI	427	244	645	275	530	∞					
SMA	241	21	10	14	8	4					
SMI	256	360	392	325	∞						
	0 h.	2 h.	4 h.	6 h.	8 h.	24 h.					
N° 6. SNA	707	133	50	61	9	∞	8800	23600	24 heures	12 heures	36 heures
SNI	974	344	285	1143	1900	∞					
SMA	2370	87	9	2	3	∞					
SMI	640	71	81	137	445	∞					

TABLEAU A (*suite.*)

Numéro de l'expérience.	Nombre des colonies à diverses époques après l'ensemencement					Agglutination.	Leucocytes av. saignée.		Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	2 h.	5 h.	8 h.	24 h.		Lapin sain.	Lapin malade.	Ap. injection.	Avant mort	
N° 7. SNA	1000	755	1512	∞		0 à 1 : 1	9600	16800	23 heures	20 heures	43 heures
SNI	900	900	2850	∞							
SMA	816	26	15		1	1 : 1					
SMI	570	35	19	8	36	1 : 10					
N° 8. SNA	800	53	10	8	∞	0 à 1 : 1	9600	21200	23 heures	13 heures	36 heures
SNI	850	945	∞								
SMA	577	35	10	»	∞	0 à 1 : 1					
SMI	980	325	310	∞		1 : 10					
N° 9. SNA	250	4	1	2	∞	0 à 1 : 1	9600	12000	21 h. 30′	20 h. 30′	42 heures
SNI	316	461	750	2350							
SMA	580	262	155	35	1000	1 : 10					
SMI	450	281	160	682	∞						
N° 10. SNA	115	11	»	»	820	0 à 1 : 1					
SNI	392	460	686	1270	∞						
N° 11. SNA	276	5	1	1	2	0	8000	»	22 heures	0	22 heures
SNI	460	100	570	314	∞	f. à 1 : 1					
SMA	1500	5229	∞			0					
SMI	980	2110	∞			0					
N° 12. SNA	534	690	2670	5580	∞	0 à 1 : 1	8800	15600	20 heures	52 heures	72 heures
SNI	593	1028	2020	2520	∞						
SMA	76	24	»	2	»	f. à 1 : 1					
SMI	260	2	»	»	»	F à 1 : 10					
SM-65°	260	"	543	950	∞	0					

Les lapins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, avaient tous au moment de la saignée beaucoup de bactéridies dans le sang.

Les lapins 7 et 9 n'en avaient pas.

Le lapin 10 est mort pendant la nuit, on n'a pu en retirer du sérum, et l'expérience est faite avec le sang. L'agglomération du sang chauffé se fait bien à 1 : 10, celle au sang non chauffé est nulle

Le sang du lapin 11 est extrait du cœur immédiatement après la mort. On n'a pu obtenir le sérum et l'expérience est faite avec le sang.

TABLEAU B

EFFET BACTÉRICIDE, SUR LE BACILLE DU CHOLÉRA, DU SÉRUM DU COBAYE NORMAL ET DU COBAYE INFECTÉ

Numéro de l'expérience	Nombre de colonies à diverses époques après l'ensemencement.					Leucocytes chez les cobayes.			Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.	Normal avant saignée.	Traité av. infection.	Malade avant saignée.	Ap. infection.	Avant mort.	
N° 1. SNA	18000		7000	∞		8400	8800	?	3 h. 40′	20′	4 heures
SNI	15000	∞									
SMA	12700	6	58	2000	∞						
SMI	8000	∞									
N° 2. SNA	140	1	5	2	»	7000	»	6800	5 h. 30′		8 jours
SNI	2000	∞									
SMA	180	1	5	8							
SMI	1228	∞									
N° 3. SNA	2350	2	1	»	∞	8800	»	6000	4 h. 30′	30′	5 heures
SNI	2420	∞									
SMA	1270	50	900	∞							
SMI	2286	∞									
N° 4. SNA	4063	17	2080	∞	»	8800	»	5600	5 h. 30′		5 h. 30′
SNI	3400	∞									
SMA	1868	840	∞								
SMI	1780	∞									
N° 5. SNA	500	4	»	2	∞				6 heures	1 heure	7 heures
SNI	504	∞	»								
SMA	360		»								
SMI	330	∞	»								

TABLEAU B (*suite.*)

Numéro de l'expérience	Nombre de colonies à diverses époques après l'ensemencement.					Leucocytes chez les cobayes.			Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h	8 h	24 h.	Normal avant saignée.	Traité av. infection.	Traité ap. infection.	Ap. infection.	Avant mort.	
N° 6. SNA	2300	»	»			7600	8800	13200	15 heures	33 heures	48 heures
SNI	2730	∞									
SNA	4500	»									
SMI	5400	∞									
N° 7. SNA	4826	»	»	100	∞	8400	6400	5200	24 heures	Agonie	24 heures
SNI	5461	∞									
SMA	250	330	820	∞							
SMI	92	1960	∞								
N° 8. SNA	7397	20	»	65	∞	7200	7600	6400	19 heures		7 jours
SNI	7700	∞									
SMA	9500	70	200	3150	∞						
SMI	13800	∞									
N° 9. SNA	10480	760	3290	∞		12000	12000	10000	18 heures	18 heures	36 heures
SNI	11370	∞									
SMA	12700	950	2030	∞							
SMI	12000	∞									
N° 10. SNA	6300	1134	380	∞		13000	13600	13800	18 heures		6 jours
SNI	4000	∞									
SMA	6400	1400	500	4	∞						
SMI	7875	∞									

TABLEAU B (*suite.*)

Numéro de l'expérience.	Nombre de colonies à diverses époques après l'ensemencement.					Leucocytes chez les cobayes.			Date de la saignée.		Durée de la maladie.
	0 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.	Normal avant saignée.	Traité av. infection.	Traité ap. infection.	Ap. infection.	Avant mort.	
N° 11. SNA	8000	35	30	210	∞	10000	10000	12000	17 heures		4 jours 1 2
SNI	15000	∞									
SMA	8570	11	»	3	∞						
SMI	8200	∞									
N° 12. SNA	7660	377	16	132	∞	8400	10000	10000	17 heures		Guéri
SNI	1600	∞									
SMA	6980	30	18	»	∞						
SMI	8980	∞									
N° 13. SNA	10100	10160	22600	∞		8000	8000	?	15 heures	15 heures	30 heures
SNI	11400	∞									
SMA	8900	4400	4760	∞							
SMI	12700	∞									
N° 14. SNA	11460	12000	3000	∞		10000	10000	?	16 heures	8 heures	24 heures
SNI	18900	∞									
SMA	12600	9450	3150	∞							
SMI	?										

Les cobayes 9, 11, 12 étaient seuls à n'avoir pas de bacilles-virgules dans le sang.
Les autres en avaient beaucoup.
Les cobayes 1 à 6 ont été inoculés avec du choléra Nasik.
Les nos 7 à 14 avec du choléra de la Prusse orientale.

NOTE SUR LA PRODUCTION DE CASÉASE

PAR UN STREPTOTHRIX PARASITE

PAR

E. BODIN — Professeur à l'École de médecine de Rennes.

ET

C. LENORMAND — Professeur à l'École de médecine de Rennes.

Dans l'étude que l'un de nous a faite [1] d'un *Streptothrix* parasite, la forme *Oospora du Microsporum* du cheval [2], il a noté la possibilité de cultiver cette mucédinée sur le lait, et a remarqué qu'elle produit dans ce liquide une transformation : mais dans ce premier travail l'aspect microscopique de la culture a seul été indiqué. L'idée nous est venue de chercher si cette transformation du lait n'est pas produite par une diastase analogue à la caséase de M. Duclaux, et, dans ce cas, quelles sont les principales conditions de la fonction diastasigène de la plante.

I°. *Culture de la forme Oospora du Microsporum sur le lait.* — Si l'on sème sur un tube de lait stérilisé des spores de la forme *Oospora du Microsporum*, et que l'on porte la culture à l'étuve à 35°, on voit vers le 4e ou 5e jour, au-dessous du bouchon crémeux jaunâtre situé à la partie supérieure du lait, se former une couche séreuse transparente de quelques millimètres de hauteur, qui gagne progressivement la partie inférieure du tube, et l'atteint au bout de 1 mois environ.

Dans une culture en surface, où la couche de lait a une faible épaisseur, la transformation marche beaucoup plus rapidement et paraît complète vers le 15e jour. A ce moment l'analyse démontre que le lactose et la matière grasse sont restés intacts,

1. E. Bodin, sur la forme Oospora (Streptothrix) du Microsporum du cheval. *Archives de parasit.*, 1899, n° 3, p. 362 et *ibid.*, 1899, n° 4, p. 606.

2. L'action pathogène de cette mucédinée chez le cheval a été démontrée par MM. Lecalvé et Malherbe (*Archiv. de parasit.*, 1899, n° 2, p. 218; 1899, n° 4, p. 489; 1900, n° 1, p. 108.. M. Bosellini vient de montrer son rôle dans l'étiologie d'une lésion à type peladoïde du cuir chevelu chez l'enfant. (*Giorn. italiano delle malat. ven e. della pelle, Fasc. III.* 1900.)

particularité qui avait déjà été signalée, pour le lactose, par MM. Lecalvé et Malherbe [1]. Quant à la caséine, elle a subi une profonde transformation, elle s'est solubilisée, elle est devenue filtrable à travers une bougie de porcelaine et présente alors les caractères de cette substance à laquelle M. Duclaux a donné le nom de *caséone*.

Voici les résultats que nous avons obtenus en étudiant la disparition progressive de la caséine dans le liquide de culture à l'étuve à 37° [2].

	Caséine.	Caséine transformée.
	—	—
Lait témoin	3gr,780	0gr,
Culture après 48 heures	3,700	0,80
— — 4 jours	2,050	1,730
— — 5 —	2,040	1,740
— — 6 —	1,330	2,450
— — 7 —	0,590	3,190
— — 8 —	0,450	3,330
— 11 —	0,230	3,550
— — 13 —	0,140	3,640
— — 14 —	0,050	3,730
— — 15 —	0,030	3,750
— — 17 —	0	3,780

Ces chiffres nous indiquent que la transformation de la caséine se fait assez lentement au début de la culture, elle progresse plus rapidement du 5e au 10e jour, et enfin elle se ralentit à ce moment; elle aboutit à la disparition totale de la caséine existant dans le liquide.

IIe. *La transformation de la caséine dans les cultures de la forme Oospora du Microsporum est due à une diastase agissant comme la caséase.* — Lorsque l'on prend une culture sur lait de notre champignon, on constate que ce liquide présente rapidement une réaction alcaline. Après les études de M. Duclaux (*Le Lait*, p. 114) on est donc en droit de se demander si la solubilité de la caséine en ce cas n'est pas due à l'alcalinité du milieu. Il n'en

1. L'intégrité de la matière grasse dans les cultures nous a conduit à n'employer dans nos expériences que le lait écrémé aussi complètement que possible. Ce lait contenait encore, suivant les échantillons, de 0gr,120 à 0gr,160 de matière grasse pour 100.

2. Nous avons dosé directement la caséine inaltérée en la précipitant de son milieu à l'aide de l'acide trichloroacétique. Avec cet acide et en l'employant toujours dans les mêmes conditions de concentration, aussi bien dans les laits témoins que dans ceux soumis à l'expérience, nous avons toujours eu d'excellents résultats. La caséine transformée se trouve représentée par la différence qui existe entre la caséine du témoin et la caséine restant dans le liquide analysé.

est rien, attendu que la combinaison, qui pourrait prendre naissance dans le milieu alcalin, est détruite au moment du traitement par l'acide trichloracétique.

D'ailleurs nous avons fait à ce sujet des expériences qui démontrent que la transformation observée, en ce cas, est bien due à une action diastasique.

Expérience A. — Une culture de la forme *Oospora du Microsporum* sur lait, dans un matras à fond plat, a été laissée à l'étuve à 35° jusqu'à disparition totale de la teinte blanche du lait : à ce moment, le liquide de culture a été filtré sous pression à la bougie Chamberland et recueilli purement ; c'est un liquide absolument limpide et offrant la teinte du bouillon concentré.

Ce liquide a été mélangé, en des fioles d'Erleumeyer, dans la proportion de 10 c. c. pour 25 c. c., à du lait écrémé et stérilisé; le mélange a été porté à l'étuve à 40°. Chaque jour l'une des fioles ainsi préparées a été soumise à l'analyse et cela nous a conduit aux résultats suivants :

	Caséine.	Caséine transformée.
	—	—
Lait témoin	3gr,240	0gr,
Au bout de 2 jours	2,020	1,220
— 4 —	1,788	1,452
— 6 —	1,784	1,456
— 7 —	1,746	1,494
— 8 —	1,704	1,536
— 9 —	1,664	1,576
— 11 —	1,660	1,580
— 13 —	1,520	1,720
— 15 —	1,480	1,760
— 18 —	1,400	1,840

Aucune action microbienne due à des impuretés ne peut être invoquée en cette expérience.

Il y a donc sécrétion d'une diastase qui se comporte vis-à-vis de la caséine comme la caséase, et que nous désignerons désormais sous ce nom.

Expérience B. — Une seconde expérience a été faite sur le liquide de culture filtré. Elle a consisté à chauffer ce liquide au bain-marie à diverses températures pendant un temps donné (15 minutes); nous avons vu ainsi qu'à 70° déjà ce liquide perd de son activité, et que cette activité diminue rapidement jusqu'à 75°, température à laquelle elle se manifeste encore, mais d'une façon très faible ; à 80° l'activité du liquide a disparu complètement et absolument. Voici en effet les chiffres trouvés pour un mélange de 5 c. c. de liquide diastasifère avec 25 c. c. de lait écrémé, laissé 8 jours à l'étuve à 40°.

	Caséine.	Caséine transformée.
Lait témoin	4gr,550	0gr
Liquide non chauffé	2,044	2,506
— chauffé à 70°	2,256	2,294
— — à 75°	4,524	0,026
— — à 80°	4,550	0

Le caractère diastasique de la réaction est donc nettement accusé[1].

Expérience C. — Enfin nous avons recherché si le liquide diastasique, ayant déjà agi sur la caséine, se retrouve, après une première action, capable de transformer de nouvelles quantités de caséine, propriété que l'on sait appartenir aux diastases en général. A notre connaissance cette expérience n'ayant pas été publiée au sujet de la caséase, nous croyons intéressant de la rapporter ici.

Un liquide de culture de la forme *Oospora* du *Microsporum* (liquide A) plus riche en caséase que ceux qui nous ont servi pour les expériences précédentes, a été filtré au filtre Chamberland et mélangé à du lait écrémé dans la proportion de 1/5; le mélange a été porté à l'étuve à 40° et l'on a constaté, au bout d'un certain temps, la quantité de caséine transformée : puis, lorsque cette quantité a paru fixe, indiquant que l'équilibre de l'action diastasique était produit, ce mélange a été filtré de nouveau au Chamberland (liquide A'), puis mélangé à du lait stérilisé écrémé, en quantité telle que la proportion de diastase soit la même que dans la 1re expérience. Nous avons vu alors l'action diastasique se produire et aboutir à des résultats que l'on peut considérer comme identiques aux premiers, ainsi que l'indiquent les chiffres que nous ont donnés les analyses. La légère différence que l'on observe entre ces chiffres est si faible que l'on peut la négliger. Elle peut s'expliquer d'ailleurs par la seconde filtration que l'on a fait subir au liquide, à travers une bougie Chamberland qui put retenir une petite quantité de diastase.

	Caséine transformée	
	avec le liquide A.	avec le liquide A'.
Au bout de 24 heures	2gr,658	2gr,474
— 4 jours	3,658	3,631

La déduction très nette qui ressort de cette expérience est donc que l'activité de la caséase ne se trouve ni diminuée, ni affaiblie par une première action sur la caséine.

1. Des essais semblables ont été faits avec d'autres liquides provenant de cultures de notre mucédinée sur d'autres milieux que le lait, liquides qui, comme nous le verrons, sont plus riches en diastase; ces essais nous ont donné des résultats absolument analogues à ceux dont nous venons de parler.

III. *Variations dans la fonction diastasigène de la mucédinée.* — D'après M. Duclaux, la production de diastase, chez les mucédinées, est une résultante des conditions physiologiques et du mode d'alimentation, fait que M. Laborde a encore mis en lumière dans ses études sur *l'Eurotiopsis Gayoni*[1]. Il est donc intéressant de rechercher si la forme *Oospora du Microsporum* produit de la caséase sur d'autres milieux nutritifs que sur le lait, si cette production ne varie pas suivant l'aliment offert à la plante, et si elle n'offre pas un rapport avec le développement de cette dernière.

Notre parasite se développe rapidement et abondamment sur les milieux neutres peptonisés et glucosés, et cela nous a conduit à utiliser les cultures sur bouillon neutre peptonisé à 1 0/0 et glucosé à 3 0/0 comme liquides diastasifères; dans ces conditions nous avons obtenu une production de caséase beaucoup plus active qu'avec le lait[2]; de plus nous avons remarqué que la quantité de caséase produite est en relation avec le glucose consommé dans la culture et avec l'état de celle-ci.

Dans un matras à fond plat, la culture de la forme *Oospora du microsporum* se développe assez rapidement à 35° sur bouillon peptonisé et glucosé, couvrant en 8 à 10 jours la presque totalité de la surface libre du liquide d'une couche assez résistante, d'aspect plissé et d'apparence plâtreuse. Il n'y a encore que peu de glucose consommé, et le liquide de culture ne renferme que très peu de caséase ; mais si l'on attend plus longtemps, jusqu'au 20e jour environ, on constate que l'aspect de la culture se modifie; la couche qu'elle forme devient moins résistante et plus mince, se brisant à la moindre agitation du liquide sous-jacent, l'aspect blanc plâtreux devient moins net, puis disparaît presque complètement, et finalement on n'a plus qu'une pellicule mince de couleur grisâtre, avec encore de-ci delà quelques points plâtreux qui ont persisté. Que l'on vienne à

1. *Laborde.* Recherches physiol. sur une moisissure nouvelle, l'Eurotiopsis Gayoni. *Th. de la faculté des sciences de Paris*, nov. 1896.

2. Afin de pouvoir comparer l'activité de nos liquides diastasifères dans les diverses expériences, nous avons procédé d'une façon analogue à celle qu'indique M. Fernbach pour le dosage de la sucrase, c'est-à-dire que nous avons fait agir, dans des conditions données de température et de réaction du milieu, le liquide diastasifère sur une quantité déterminée de caséine.

Toutes nos expériences ont été faites en milieux présentant une réaction légèrement alcaline et, après divers essais, nous avons adopté la température de 40°, qui nous a paru la plus favorable à l'action diastasique.

faire des prises successives dans le liquide de culture, on notera une diminution progressive du glucose allant jusqu'à la disparition totale de cette substance, et en outre on verra se produire une coloration brune de plus en plus marquée. Au fur et à mesure, la quantité de caséase augmente et paraît à son maximum au moment où le glucose a disparu complètement, et où la plante, présentant des phénomènes d'inanition et de désassimilation, s'est comme flétrie.

Nous donnons ici un résumé de ces faits en un tableau dans lequel les chiffres représentent la caséine transformée, à 40°, dans un lait titrant 4 gr. 220 de caséine, par des liquides de culture sur bouillon neutre peptonisé à 1 0/0 et glucosé à 3 0/0, filtrés à la bougie Chamberland. Le liquide n° 1 correspond à une culture d'aspect florissant, dans laquelle il n'y avait que 0 gr. 43 0/0 de glucose consommé; dans le liquide n° 2 le glucose consommé atteignait 1 gr. 62 0/0 et la plante commençait à se flétrir; enfin le liquide n° 3 a été filtré le lendemain du jour où l'on a constaté la disparition complète du glucose : le champignon n'était plus alors représenté que par cette mince pellicule grisâtre dont nous parlions tout à l'heure.

		LIQUIDE de culture n° 1.	LIQUIDE de culture n° 2	LIQUIDE de culture n° 3
Glucose consommé.....		0gr,43	1gr,62	3gr
Caséine transformée.	Au bout de 24 heures.	0,038	0,190	2,658
	Au bout de 48 heures.	0,484	1,186	3,290
	Au bout de 3 jours.	0,582	1,668	3,506
	Au bout de 4 jours.	0,618	1,986	3,658

Il n'est pas inutile de faire ressortir combien ces faits sont analogues à ceux que M. Fernbach[1] a signalés pour l'Aspergillus et M. Laborde pour l'Eurotiopsis Gayoni.

1. Fernbach, *Th. de la Faculté des sciences de Paris*, décembre 1890.

Les chiffres suivants montreront combien la caséase que donne notre champignon sur le bouillon neutre peptonisé et glucosé est plus active que celle qu'il produit sur le lait écrémé.

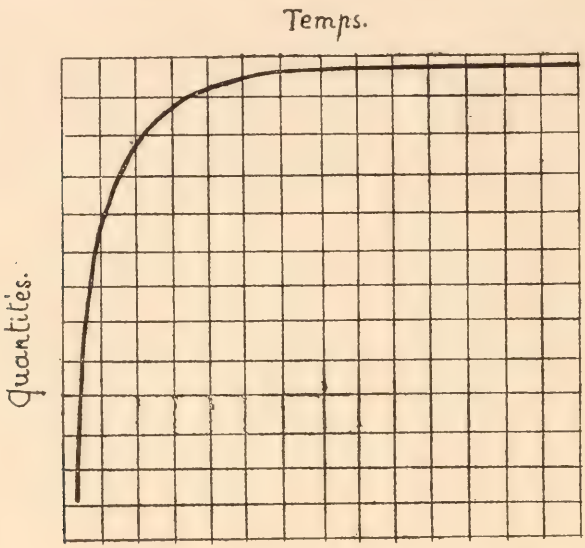
Nous indiquerons aussi à ce sujet que nous avons observé, dans nos expériences, les mêmes phénomènes que M. Duclaux a décrits dans ses recherches sur le lait. Avant l'action de la caséase sur la caséine, il se produit une coagulation de cette substance, probablement sous l'influence de présure que produit la mucédinée en même temps que la caséase, mais cette coagulation est variable suivant la quantité de diastase employée.

Emploie-t-on une quantité relativement faible de liquide diastasifère, il se produit un caillé homogène et gélatiniforme qui se dissout ensuite progressivement : c'est ce que nous avons observé en mélangeant 5 c. c. de liquide diastasifère actif à 25 c. c. de lait écrémé. Mais si l'on mélange le liquide diastasifère en de plus fortes proportions avec le lait, à parties égales par exemple, la coagulation se fait en petits grumeaux et peut passer inaperçue.

MÉLANGE DE 5 C. C. DE LIQUIDE DE CULTURE SUR BOUILLON PEPTONISÉ, GLUCOSÉ ET DE 25 C. C. DE LAIT ÉCRÉMÉ (ÉTUVE A 40°)

	Caséine.	Caséine transformée.
Lait témoin	3gr,780	0gr
Au bout de 2 heures	3,330	0,450
— 4 —	3,278	0,502
— 6 —	2,774	1,006
— 8 —	2,706	1,074
— 10 —	2,390	1,390
— 14 —	2,238	1,542
— 16 —	1,746	2,034
— 18 —	1,690	2,090
— 20 —	1,660	2,120
— 24 —	1,410	2,370
— 28 —	1,276	2,504
— 32 —	1,226	2,554
— 40 —	0,986	2,794
— 48 —	0,794	2,986
3 jours	0,551	3,229
— 4 —	0,478	3,302
— 5 —	0,380	3,400
— 6 —	0,347	3,433
— 8 —	0,331	3,449
— 18 —	0,331	3,449

Que l'on vienne à traduire ces résultats par une courbe, et l'on obtiendra le tracé ci-joint qui offre les allures d'une courbe exponentielle, asymptote à l'axe horizontal des temps, telle que celle qui représente l'action des diastases en général.



En mélangeant à parties égales le liquide diastasifère de notre mucédinée avec le lait écrémé, et en portant ce mélange à 40°, on trouve qu'après 5 heures les 9/10 de la caséine initiale ont été transformés, et qu'au bout de 9 heures l'équilibre que l'on constate à la fin des actions diastasiques est atteint.

IV. *Action du liquide diastasifère sur la gélatine.* — Dans ses travaux sur les levures, M. Boullanger[1] a montré que, pour ces microorganismes, le pouvoir liquéfiant vis-à-vis de la gélatine est en rapport avec la production de caséase, et l'on sait d'autre part que Fermi, dans ses études, confond la trypsine et la diastase liquéfiant la gélatine, de telle sorte que l'on peut se demander si la caséase, la diastase liquéfiant la gélatine et la trypsine doivent être confondues, ou s'il faut distinguer ces 3 diastases.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il est impossible de répondre à cette question, mais nous avons pensé qu'il n'était pas sans intérêt de rechercher comment se comporte vis-à-vis

1. Boullanger, ces *Annales*, 1897, p, 721.

de la gélatine le liquide diastasifère, riche en caséase, obtenu avec notre mucédinée qui dans ses cultures liquéfie rapidement la gélatine. Nos expériences à ce sujet nous ont conduit à des résultats analogues à ceux de M. Boullanger.

Plusieurs tubes contenant chacun 10 c. c. d'une solution de gélatine à 15 0/0 ont été stérilisés à l'autoclave : puis, après avoir attendu que la gélatine se soit refroidie, mais avant qu'elle se soit prise en masse, on a ajouté, au tube n° 1, 2 c. c. d'un liquide de culture sur bouillon, peptonisé à 1 0/0 et glucosé à 3 0/0, riche en caséase ; un autre tube, n° 2, a reçu 1 c. c. du même ; dans le tube n° 3 on a introduit 2 c. c. de liquide diastasifère chauffé préalablement à 100° afin de constituer un témoin.

Ces 3 tubes, après avoir été agités pour bien opérer le mélange de la diastase et de la gélatine, ont été refroidis rapidement jusqu'à ce que la gélatine ait fait prise. Enfin un tube n° 4 a été refroidi dans la position verticale, le niveau de la gélatine a été marqué à l'aide d'un index en papier, et l'on a versé dans ce tube 5 c. c. du liquide diastasifère. Tous ces tubes ont été portés dans une étuve à 20° ; au bout de 24 heures le tube n° 1 est complètement liquéfié ; la gélatine du tube n° 2 est ramollie, mais la liquéfaction n'est complète qu'au bout de 48 heures. Pour ces tubes, il est impossible de déterminer par refroidissement la solidification de la gélatine liquéfiée.

Dans le tube n° 4, où le liquide diastasifère n'est en contact avec la gélatine que sur une faible surface, la liquéfaction se produit aussi et progresse lentement. Elle est complète au bout de 35 jours.

Quant au tube n° 3 destiné à servir de témoin, la gélatine s'y est maintenue solide, les phénomènes observés dans les autres tubes sont donc bien dus à une action diastasique.

La même expérience a été reproduite avec d'autres liquides diastasiques provenant de cultures sur bouillon peptonisé et glucosé et de cultures sur lait, et les résultats ont été les mêmes, avec cette particularité toutefois que la liquéfaction de la gélatine s'est faite d'autant moins vite que le liquide diastasifère était moins riche en caséase.

On sait enfin que l'on a signalé l'action de la caséase sur d'autres albuminoïdes, ce qui nous a porté à expérimenter le liquide diastasifère de notre champignon sur l'albumine de l'œuf

coagulée et non coagulée, sur le sérum de bœuf et sur le sérum d'ascite. Dans divers essais, nous avons observé d'importantes modifications microscopiques sur le sérum de bœuf coagulé, qui se liquéfie lentement, et sur l'albumine coagulée, qui se transforme en une masse transparente et gélatiniforme, exhalant une odeur de peptones très nette ; nous avons en outre noté dans tous les cas une diminution progressive de l'albumine existant au début de l'expérience, mais cette diminution s'est faite lentement et en faibles proportions. Nous nous contenterons donc, pour le moment, de signaler ces particularités, nous réservant d'y revenir ultérieurement.

CONCLUSIONS

1° La mucédinée parasite que l'un de nous a décrite sous le nom de forme *Oospora* du *Microsporum* du cheval produit, dans ses cultures, une diastase qui, comme la présure, coagule la caséine et une autre diastase qui dissout ce coagulum comme la caséase ;

2° La quantité de caséase existant dans le liquide de culture de cette mucédinée varie avec le milieu nutritif offert à la plante et avec l'état physiologique de celle-ci. Cette quantité de caséase nous a paru la plus grande dans les milieux neutres, peptonisés et glucosés, au moment où la totalité du glucose est consommée, et où la plante présente des phénomènes d'inanition et de désassimilation. Dans ces conditions, ce champignon peut être considéré comme un actif producteur de caséase ;

3° Le liquide diastasifère, contenant de la caséase, obtenu avec la forme *Oospora* du *Microsporum*, liquéfie la gélatine de telle sorte qu'il est impossible de la solidifier par refroidissement, et la liquéfaction de la gélatine est d'autant plus rapide que le liquide diastasifère est plus riche en caséase.

En outre le liquide diastasifère de la plante s'est montré actif vis-à-vis d'autres substances albuminoïdes : albumine de l'œuf, du sérum de boeuf, du sérum d'ascite.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE — MAI 1901 — N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Sur l'Existence de Substances sensibilisatrices
DANS LA PLUPART DES SÉRUMS ANTIMICROBIENS

PAR LES Drs JULES BORDET ET OCTAVE GENGOU.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Le sérum de nombreux animaux renferme de l'alexine, c'est-à-dire une matière mal définie, encore inconnue dans sa constitution chimique, à la présence de laquelle on attribue cette propriété qu'ont généralement les sérums, d'exercer une influence destructive sur diverses cellules et sur certains microbes. L'alexine perd son activité lorsqu'on chauffe à 55° le sérum qui la contient. Cette matière se rencontre, en doses fort comparables, dans le sérum des animaux neufs et dans celui des vaccinés : l'immunisation artificielle n'en modifie sensiblement ni la quantité, ni les caractères.

Lorsqu'on vaccine un animal contre le vibrion cholérique, l'organisme élabore une substance particulière, la matière préventive ou *sensibilisatrice*, dont on peut dénoter la présence dans le sérum et qui résiste à des températures assez élevées. Elle n'est, par elle-même, nullement bactéricide pour le vibrion. Mais elle favorise considérablement, et cela d'une manière spécifique, l'action destructive que l'alexine peut exercer sur ce microbe. Aussi peut-on dire que la propriété vibrionicide spécifique du choléra-sérum, bien que due en première ligne à l'alexine, laquelle est la matière destructive proprement dite, résulte de la collaboration de deux substances, d'une part l'alexine, d'autre part la matière favorisante (sensibilisatrice)

dont seul le sérum des vaccinés est largement doté. Ces notions, que l'un de nous a établies en 1895, expliquent, on le sait, les diverses propriétés du choléra-sérum. Elles s'appliquent étroitement aussi aux sérums hémolytiques spécifiques, dont les caractères présentent, avec ceux du choléra-sérum, les analogies les plus évidentes. En résumé, si les sérums bactério ou cytolytiques sont doués d'un pouvoir destructif si intense, c'est parce qu'ils contiennent, outre l'alexine banale, un anticorps spécifique, la sensibilisatrice.

Nous n'avons cité, dans les lignes qui précèdent, parmi les sérums provenant d'animaux vaccinés contre les microbes, que le choléra-sérum. De fait, il eût été hasardé d'affirmer la présence de matières sensibilisatrices spécifiques dans la généralité des sérums antimicrobiens. En effet, jusqu'ici, l'existence de ces matières n'a été démontrée, avec une certitude complète, que dans le sérum d'animaux vaccinés contre le vibrion cholérique ou d'autres vibrions analogues.

Cela se conçoit aisément si l'on réfléchit à la méthode que l'on possède actuellement pour mettre en évidence la substance sensibilisatrice. Cette méthode est celle que l'un de nous a fait connaître pour ce qui concerne le choléra-sérum, et qu'il a appliquée ensuite aux sérums hémolytiques. C'est la suivante :

On mélange, en doses convenables, des vibrions cholériques, d'une part avec du sérum d'animal neuf, d'autre part avec du sérum d'animal vacciné contre ces vibrions. On constate que. dans le second mélange, l'immense majorité des microbes se transforment en granules, métamorphose qui trahit une influence bactéricide intense. Dans le premier mélange, l'action microbicide est au contraire fort minime : quelques vibrions seulement dégénèrent, donnant lieu également à des granules; la lésion subie par le microbe est morphologiquement la même, mais elle est légère, n'atteint qu'un petit nombre d'individus. On constate facilement, d'autre part, que le choléra-sérum et le sérum neuf perdent tous deux complètement leur pouvoir bactéricide lorsqu'on les chauffe à 55°. Mais si l'on ajoute, à du sérum non chauffé d'animal neuf, une dose même faible de choléra-sérum qui a été chauffé à 55°, le mélange obtenu est très fortement bactéricide, et se comporte comme du choléra-sérum non chauffé : il transforme très activement les vibrions en gra-

nules. Ceci démontre que le choléra-sérum avait gardé, après le chauffage, une matière qui n'est point antiseptique par elle-même, mais qui favorise énergiquement l'influence bactéricide de l'alexine présente dans le sérum neuf.

On le voit, cette méthode exige, pour déceler l'existence d'une sensibilisatrice, que le microbe considéré soit susceptible de subir, au contact du sérum actif, une lésion facilement constatable au microscope : il faut qu'on puisse observer de la bactériolyse. De même, pour les sérums hémolytiques, le réactif indispensable, c'est l'hémolyse.

Mais tous les microbes ne satisfont pas à cette exigence. Beaucoup ne se laissent pas détruire, ni même visiblement altérer, au contact des sérums d'animaux même solidement immunisés. Dans de pareils cas, la méthode que nous venons de rappeler se trouve en défaut, et il convient de la remplacer par une autre.

C'est donc un procédé différent que nous allons mettre en œuvre pour démontrer la présence de sensibilisatrices dans les sérums d'animaux vaccinés contre des microbes tels que le bacille pesteux, le premier vaccin charbonneux, le bacille d'Eberth, le bacille du rouget des porcs, le Proteus vulgaris.

Nous devons, au préalable, rappeler au lecteur une expérience relatée il y a un an dans ces *Annales*[1], et dont le principe est le suivant :

Si l'on ajoute, à une dose convenable de sérum d'animal neuf, tel que le cobaye (sérum récemment obtenu, non chauffé, contenant donc de l'alexine), des globules rouges (de lapin par exemple) fortement *sensibilisés* (c'est-à-dire mélangés à du sérum hémolytique, actif vis-à-vis de ces globules, et qui a été chauffé à 55°), on observe, comme on sait, la destruction des hématies. Au bout d'un certain temps, on introduit dans le mélange des vibrions cholériques *sensibilisés* (additionnés de choléra-sérum préalablement chauffé à 55°) et l'on met à l'étuve à 37°. On constate que le vibrion ne se transforme pas en granules, garde sa forme normale. On peut affirmer, en conséquence, qu'au moment où l'on a introduit les vibrions, le mélange ne contenait plus d'alexine : en effet, on le sait, les vibrions sensibilisés

1. Bordet, Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. Ces *Annales*, mai 1900.

donnent rapidement des granules dès qu'ils rencontrent cette substance. Des mélanges témoins montrent, bien entendu, que les vibrions se seraient parfaitement transformés, si les hématies mêlées au sérum neuf *n'avaient pas été sensibilisées.*

On peut réaliser la même expérience en faisant intervenir les deux éléments, globules et microbes, dans l'ordre inverse. Si l'on mélange, à du sérum neuf alexique, une dose convenable de vibrions cholériques sensibilisés, on peut, après un certain temps, introduire dans le liquide des globules sensibilisés, sans que ces hématies subissent la moindre altération : l'hémolyse fait totalement défaut.

Ces expériences ont établi, on s'en souvient, deux notions bien distinctes : 1°) Les globules ou les microbes acquièrent, *sous l'influence de la sensibilisation, le pouvoir d'absorber avidement l'alexine*, et de la faire disparaître ainsi du liquide ambiant; 2°) Dans un même sérum, *la même alexine* peut provoquer, soit l'hémolyse, soit la bactériolyse[1].

Ces notions sont confirmées à nouveau dans un mémoire publié dans ce même numéro des *Annales*. Dans le présent article, la donnée qui nous importe, et que l'expérience citée suggère, est la suivante : On peut utiliser, *pour dénoter l'existence d'une sensibilisatrice dans un sérum antimicrobien*, la propriété dont cette substance est douée, de faire absorber l'alexine par le microbe qu'elle impressionne.

Comme l'expérience, fondée sur ce principe, est à peu près toujours la même pour les divers sérums antimicrobiens étudiés, nous allons la décrire en détail, une fois pour toutes. Opérons pour commencer sur le sérum antipesteux.

Sérum de cheval vacciné contre le bacille de la peste. — Ce sérum, qui est fortement préventif, nous a été obligeamment fourni par M. le docteur Dujardin-Beaumetz, qui le prépare à l'Institut Pasteur et en contrôle l'activité.

On chauffe ce sérum à 56° pendant une demi-heure, en même temps que du sérum de cheval neuf; ce chauffage rend l'alexine inactive. Une culture sur gélose de bacille pesteux, âgée de 24 heures, est délayée dans une quantité assez faible de la solution physiologique de NaCl; on obtient ainsi une

1. Cette thèse de l'unité de l'alexine (bactériolytique ou hémolytique) dans un même sérum est admise également, on le sait, par M. Buchner.

émulsion bien trouble, riche en microbes. On dispose, en outre, de sérum bien débarrassé de globules par la centrifugation, et provenant d'un cobaye neuf qui a été saigné la veille. C'est le sérum alexique. On prépare, dans des tubes à réactifs, les six mélanges suivants :

a) Ce tube contient : 2/10 de c. c. de sérum alexique ; 4/10 de c. c. d'émulsion de bacilles pesteux ; 12/10 de c. c. de sérum antipesteux (préalablement chauffé à 56°).

b) Comme le précédent, ce mélange renferme 2/10 de c. c. de sérum alexique et 4/10 de c. c. d'émulsion de bacilles. Mais il contient, au lieu de sérum antipesteux de cheval, 12/10 de c. c. de sérum de cheval neuf (préalablement chauffé à 56°).

c) Ce mélange est identique à *a*, sauf qu'il ne renferme pas d'émulsion pesteuse. Il se compose donc de 2/10 de c. c. de sérum alexique, et de 12/10 de c. c. de sérum antipesteux.

d) Identique à *b*, sauf qu'il ne renferme pas d'émulsion de bacilles. Il se compose donc de 2/10 de c. c. de sérum alexique, et de 12/10 de c. c. de sérum de cheval neuf.

Ces quatre premiers mélanges renferment tous, on le voit, la même dose d'alexine (sérum de cobaye neuf).

e) contient : 4/10 de c. c. d'émulsion pesteuse ; 12/10 de c. c. de sérum antipesteux.

f) contient : 4/10 de c. c. d'émulsion pesteuse ; 12/10 de c. c. de sérum de cheval neuf.

Ces deux derniers tubes sont respectivement semblables à *a* et *b*, sauf qu'ils ne contiennent pas d'alexine.

On attend cinq heures environ. pendant lesquelles les mélanges restent à la température du laboratoire (15-20°). On introduit ensuite dans les divers tubes, au même moment, 2/10 de c. c. d'un mélange ainsi constitué : 2 c. c. de sérum, (préalablement chauffé pendant une 1/2 heure à 55°-5), provenant d'un cobaye traité antérieurement par trois ou quatre injections de 4-5 c. c. de sang défibriné de lapin : 20 gouttes de sang défibriné de lapin[1]. En d'autres termes, chaque tube reçoit deux gouttes de *sang très fortement sensibilisé.*

1. Ainsi qu'on l'a mentionné dans des mémoires précédents, on emploie généralement, pour ce genre d'expériences, du sang préalablement « lavé » à l'eau physiologique. On met dans un tube 1 à 2 c. c. de sang défibriné ; on marque sur le verre le niveau auquel ce volume de sang s'élève ; on remplit alors le tube d'eau physiologique ; on centrifuge. Quand les globules se sont

Voici le résultat de l'expérience :

L'hémolyse apparaît très vite, avec une rapidité très semblable, dans les tubes *b*, *c*, *d*. Au bout de 5-10 minutes ces mélanges ne renferment plus de globules intacts. Dans le tube *a*, qui renferme, outre le sérum alexique, les bacilles et le sérum antipesteux, *l'hémolyse ne se produit pas*. Les globules y restent intacts pendant des jours entiers. Ils restent intacts aussi, comme il fallait s'y attendre, dans les tubes *e*, *f*, qui ne contiennent pas d'alexine. Nous voyons donc que : 1° le bacille pesteux mélangé à du sérum de cheval neuf n'absorbe pas (ou n'absorbe que d'une manière insignifiante) l'alexine ; 2° ce même bacille, en présence du sérum antipesteux de cheval vacciné, fixe l'alexine avec beaucoup d'avidité, et la fait disparaître du liquide ambiant ; 3°) le sérum antipesteux. non additionné de bacilles, laisse l'alexine parfaitement libre.

En conséquence, il faut conclure que le sérum d'un cheval vacciné contre le bacille pesteux contient une *sensibilisatrice qui confère à ce microbe le pouvoir de fixer l'alexine*. Cette sensibilisatrice se comporte donc comme les substances correspondantes que l'on trouve dans le choléra-sérum et les sérums hémolytiques.

Ajoutons que si l'on introduit, dans un mélange d'alexine et de sérum antipesteux, une petite quantité de bacilles, les microbes ne subissent, après un séjour de 3 heures à 37°, aucune altération morphologique perceptible. En conséquence, dans le cas du sérum antipesteux, la présence d'une sensibilisatrice ne pourrait guère se déceler que grâce à la constatation de la fixation de l'alexine.

Si l'on répète l'expérience décrite plus haut, en ne faisant intervenir, pour une même quantité d'alexine (2/10 de c. c.), que des doses notablement plus faibles d'émulsion de bacilles et de sérum antipesteux, la fixation de l'alexine ne s'opère pas complètement. Les globules sensibilisés que l'on introduit subissent l'hémolyse, mais avec un retard plus ou moins considérable.

Sérum de cobayes vaccinés contre le premier vaccin charbon-

déposés, on aspire tout le liquide dans une pipette à boule, en ne laissant que les hématies. On rétablit ensuite, en ajoutant un peu d'eau physiologique, le volume que le sang occupait primitivement. On a ainsi du sang défibriné dont le sérum est remplacé par de l'eau physiologique, et qui ne contient donc pas d'alexine.

neux. — On injecte dans le péritoine de cobayes, à quatre reprises, une dose assez forte de premier vaccin charbonneux. Pour les deux premières injections, on emploie des cultures en bouillon peptonisé, âgées de 5-6 jours. Pour les deux dernières, on emploie des cultures sur gélose, âgées de 3 à 4 jours, que l'on délaie dans la solution physiologique.

On fait une expérience tout à fait identique à celle que nous avons décrite à propos du sérum antipesteux. Comme témoin du sérum (chauffé 1/2 heure à 56°) fourni par les cobayes vaccinés contre le 1er vaccin, on emploie naturellement du sérum neuf, chauffé à 56°, de la même espèce (cobaye). On utilise une émulsion, dans la solution physiologique, de 1er vaccin provenant d'une culture sur gélose âgée de 24 heures. L'alexine est du sérum récent, de cobaye neuf.

Les résultats sont identiques à ceux qu'on vient de constater à propos du bacille pesteux. En présence de sérum neuf, le premier vaccin n'absorbe pas (ou très peu) l'alexine. La fixation est complète en présence du sérum spécifique. L'analogie se poursuit en ce que la fixation de l'alexine ne comporte pas de lésions bien nettes du microbe.

Sérum d'un cheval vacciné contre le rouget du porc. — M. Frasey, de l'Institut Pasteur, nous a obligeamment fourni un sérum fortement préventif contre le microbe du rouget. Dans ce cas encore, nous avons pu mettre en évidence, par les mêmes procédés, une sensibilisatrice provoquant la fixation de l'alexine par le bacille du rouget.

Sérum de cobayes vaccinés contre la fièvre typhoïde. — Les cobayes avaient reçu trois injections d'émulsion de bacille d'Eberth, obtenue en délayant une culture sur gélose dans la solution physiologique.

L'expérience est calquée sur les précédentes. Elle révèle une fixation d'alexine très énergique, par le bacille d'Eberth, sous l'influence du sérum actif. Il nous a paru intéressant de rechercher si la sensibilisation par ce sérum, qui amène à sa suite l'absorption de l'alexine, est strictement spécifique.

A cet effet, l'expérience a été faite en double. Elle est la répétition des expériences précédentes, et comprend les divers mélanges constitués comme il a été dit plus haut. Mais l'on fait intervenir, d'une part, le bacille typhique qui a servi à

vacciner les animaux. D'autre part, on met en jeu le bacille coli. Les cultures sur gélose (âgées de 24 heures) de bacille typhique et de coli ont été délayées dans une dose semblable (4 c. c.) de la solution physiologique. Les surfaces de gélose ensemencées, soit de B. typhique, soit de B. coli, avaient très approximativement la même étendue; néanmoins l'émulsion de B. coli était certainement la plus riche en microbes, car la culture était visiblement plus abondante que celle du bacille d'Eberth. Nous notons ce détail, car il faut être sûr que si le bacille coli, mêlé au sérum antityphique, ne fixe pas ou fixe mal l'alexine, ce n'est pas parce que les microbes sont en quantité insuffisante.

Le résultat que donne une pareille expérience est très net : L'influence exercée par le sérum antityphique manifeste une spécificité incontestablement très marquée, mais qui n'est pas absolue. En effet, le B. coli, mélangé au sérum antityphique, acquiert, à un certain degré, le pouvoir d'absorber l'alexine. Mais, tandis que des doses relativement faibles de bacille typhique et du sérum actif absorbent cette substance d'une manière parfaitement complète, il faut des quantités relativement fortes de B. coli et du même sérum pour qu'on puisse constater une fixation encore partielle, mais assez marquée néanmoins pour être évidente. Par exemple, les hématies sensibilisées, introduites dans un mélange (préparé quelques heures auparavant) de 2/10 de c. c. d'alexine (sérum de cobaye neuf non chauffé), 2/10 de c. c. d'émulsion *typhique*, 6/10 de c. c. de sérum antityphique (préalablement chauffé à 56°), restent indéfiniment intactes; elles ne se détruisent qu'au bout d'une heure dans un mélange contenant la même dose d'alexine (2/10 de c. c.), mais des quantités deux fois plus fortes du sérum actif et d'émulsion de *coli* (4/10 d'émulsion, 12/10 de sérum antityphique). Dans ce dernier mélange, l'hémolyse se fait donc, mais avec un réel retard; en effet, les globules sensibilisés sont détruits au bout de quinze minutes environ dans les mélanges témoins, renfermant chacun 2/10 d'alexine, 12/10 de sérum de cobaye neuf (préalablement chauffé à 56°) et 4/10 d'émulsion, soit de B. typhique, soit de B. coli. L'hémolyse s'effectue un peu plus rapidement encore dans deux mixtures qui ne renferment pas de microbes, et qui sont composées, soit de 2/10 de c. c. d'alexine

et de 12/10 de sérum antityphique (chauffé à 56°), soit de 2/10 de c. c. d'alexine et de 12/10 de sérum de cobaye neuf (chauffé à 56°).

Le bacille coli a donc ressenti, bien plus légèrement il est vrai que le bacille typhique, l'influence sensibilisatrice du sérum actif[1].

Sérum humain, provenant de convalescents de la fièvre typhoïde. — M. le Dr Widal a bien voulu nous autoriser à recueillir, dans son service à l'hôpital, par piqûre du doigt, 3 ou 4 c. c. de sang de deux femmes convalescentes de la fièvre typhoïde. Ces deux personnes avaient présenté, de la manière la plus typique, la marche et tous les symptômes classiques de la maladie. Au moment où nous avons extrait le sang, la fièvre était tombée depuis 20 à 30 jours.

Les sérums fournis par ces deux échantillons de sang sont chauffés pendant 1/2 heure à 56°, en même temps que deux sérums témoins, provenant des deux auteurs de ce mémoire, lesquels n'ont jamais été atteints de fièvre typhoïde. Une petite quantité de l'un de ces sérums témoins n'est pas chauffée, il sert dans l'expérience comme sérum alexique.

Le résultat a été très démonstratif. Dans les tubes contenant l'alexine (2/10 de c. c. de sérum humain non chauffé), l'émulsion[2] de bacilles typhiques (5/10 de c. c.), l'un ou l'autre (9/10 de c. c.) de nos propres sérums (préalablement chauffés à 56°), aucune fixation d'alexine ne s'est effectuée. L'hémolyse des globules (de lapin) sensibilisés que l'on introduit après quelques heures s'opère très rapidement, aussi vite, à très peu près, que dans des mélanges témoins composés des mêmes doses des mêmes sérums, mais qui ne renferment pas de bacilles.

Au contraire, dans les mélanges contenant, en proportions correspondantes, l'alexine humaine, le bacille typhique, l'un ou l'autre des deux sérums (préalablement chauffés à 56°) provenant des convalescents, les globules sensibilisés que l'on ajoute gardent leur hémoglobine pendant des jours entiers. Dans les

1. Ajoutons que ce sérum a agglutiné très fortement le bacille typhique; l'influence agglutinante exercée sur le B. coli n'a pas été nettement supérieure à celle du sérum normal.

2. On prépare l'émulsion en délayant une culture sur gélose de bacille typhique, âgée de 24 heures, dans 5 c. c. de la solution physiologique de NaCl à 0,7 0/0.

mélanges similaires, mais dépourvus de bacilles, l'hémolyse se fait, bien entendu, avec la rapidité habituelle.

En conséquence, le pouvoir de faire absorber l'alexine humaine par le bacille typhique [1] est bien accusé dans le sérum des convalescents [2].

Il serait fort intéressant de rechercher jusqu'à quel point le pouvoir sensibilisateur d'un tel sérum revêt le caractère de la spécificité; il serait désirable, en particulier, de faire porter l'expérience parallèlement sur le bacille typhique et sur le B. coli. En outre, la question se pose de savoir à quelle période de la maladie ce pouvoir apparaît dans le sérum; l'étude de ce sujet nécessitera l'examen d'un grand nombre de cas. Nous n'avons pu, jusqu'ici, faute de matériel et surtout de temps, réaliser ces deux desiderata.

Sérum de cobayes vaccinés contre le Proteus vulgaris. — Pour démontrer l'existence d'une sensibilisatrice dans ce sérum, il est superflu d'avoir recours à la méthode, fondée sur l'absorption de l'alexine, qui nous a servi pour les exemples précédents. En effet, le *Proteus vulgaris* employé dans nos expériences subit, au contact du sérum actif (récemment extrait), une dégénérescence en granules très semblable à celle que présente le vibrion cholérique sous l'influence du choléra-sérum.

On sait que la métamorphose du vibrion s'effectue aussi, à un degré généralement assez faible, sous l'action du sérum de cobaye neuf. De son côté, le *Proteus vulgaris* se transforme très bien en granules au contact d'une dose assez notable de ce dernier liquide. Mais une quantité beaucoup plus faible de ce sérum suffit à provoquer le phénomène, lorsqu'on a soin d'ajouter au mélange un peu de Proteus-sérum, soit frais, soit préalablement chauffé à 55°. Ceci démontre, on le sait, l'existence d'une sensibilisatrice dans le sérum des vaccinés.

Néanmoins, nous n'avons pas négligé de faire pour le *Proteus vulgaris* l'expérience de la fixation de l'alexine. Elle a donné le

1. Le bacille typhique employé avait été recueilli dans les meilleures conditions, et contrôlé avec toute la rigueur désirable, par M. le Dr Binot, de l'Institut Pasteur, qui nous a très obligeamment procuré cette culture.

2. Ces sérums de convalescents ne se sont montrés que faiblement agglutinants pour le bacille typhique. Il y a lieu de rappeler, à ce propos, les observations de MM. Pfeiffer et Kolle; ces savants ont montré que le pouvoir agglutinant de pareils sérums ne marche pas de pair avec le pouvoir bactéricide spécifique.

résultat attendu : le microbe n'absorbe pas, ou absorbe très peu l'alexine en présence de sérum de cobaye neuf, s'en empare au contraire lorsqu'il est impressionné par le sérum spécifique. Dans ce dernier cas, les globules sensibilisés qui servent de réactif sont complètement préservés de la destruction.

Dans les expériences mentionnées jusqu'ici, nous nous sommes constamment servis, pour rechercher si l'alexine de nos mélanges s'est fixée ou se trouve encore à l'état libre dans le liquide, de globules de lapin sensibilisés par du sérum hémolytique (provenant de cobayes injectés de sang de lapin) chauffé au préalable à 55°. Conformément à la notion, démontrée il y a un an, de l'unité de l'alexine hémo ou bactériolytique, nous eussions pu tout aussi bien mettre en œuvre un autre réactif, soit des globules différents, soit un microbe sensibilisé, tel que le vibrion cholérique, capable de trahir par son altération morphologique la présence d'alexine libre.

C'est ce que nous avons réalisé à propos du *Proteus vulgaris*. Décrivons brièvement cette expérience :

On délaie dans 6 c. c. de la solution physiologique de NaCl, une culture sur gélose de *Proteus vulgaris*, âgée de 24 heures. On traite de même une culture sur gélose de vibrion cholérique. On dispose de sérum, récemment obtenu et non chauffé, de cobaye neuf (sérum alexique) ; on se sert, en outre, de Proteus-sérum et de choléra-sérum.

On prépare dans les tubes les mélanges :

a) 2/10 de c. c. de sérum alexique; 3/10 de c. c. d'émulsion de Proteus; 6/10 de c. c. de Proteus-sérum (préalablement chauffé à 56°).

b) 2/10 de c. c. de sérum alexique ; 3/10 d'émulsion de Proteus ; 6/10 de c. c. de sérum de cobaye neuf, préalablement chauffé à 56°.

c) Mélange semblable à *a*, sauf qu'il ne contient pas de microbes.

d) Mélange semblable à *b*, sauf qu'il ne contient pas de microbes.

Cinq heures après la préparation de ces mixtures, on ajoute à chacun des tubes 2/10 de c. c. d'un mélange ainsi constitué : 1/2 c. c. d'émulsion de vibrions cholériques, 1 c. c. de choléra-sérum (provenant d'un cobaye fortement immunisé) préala-

blement chauffé à 56°. On met ensuite les mélanges à l'étuve; au bout d'une heure et demie, on les en retire, et l'on fait des préparations colorées.

On constate que le vibrion cholérique a gardé sa forme allongée normale dans *a;* dans ce mélange, on ne trouve plus de bâtonnets normaux de Proteus; ce microbe s'est complètement transformé en granules. — Dans le tube *b*, on voit au contraire de nombreux bâtonnets intacts de *Proteus vulgaris*. Mais il est impossible d'y découvrir des vibrions présentant leur aspect habituel : la métamorphose a été complète.

Dans les tubes *c* et *d*, lesquels ne contiennent pas d'émulsion de Proteus, le vibrion s'est totalement transformé en granules, ainsi qu'il fallait s'y attendre [1]. Il faut admettre, en résumé, que dans le tube *a*, le Proteus sensibilisé a absorbé l'alexine et a préservé en conséquence les vibrions ultérieurement introduits.

Les mélanges séjournent jusqu'au lendemain à la température assez basse du laboratoire. Le lendemain on met à l'étuve les tubes *a* et *b*, pendant six heures, après quoi on en fait des préparations colorées. Ce qu'elles montrent est frappant.

Dans le tube *a*, où l'alexine a été consommée par le Proteus, le vibrion cholérique s'est très abondamment multiplié; par contre, on ne trouve aucun bâtonnet de Proteus. Dans le tube *b*, où le Proteus n'était pas sensibilisé, les choses se sont passées d'une manière complètement inverse : on trouve une culture extrêmement riche de bâtonnets normaux de Proteus; on n'y rencontre aucune forme allongée, intacte, de vibrion cholérique. En conséquence, dans ces deux tubes, qui tous deux contiennent la même dose d'alexine, le pouvoir bactéricide a été *dirigé* soit contre l'un, soit contre l'autre des deux microbes. Le vibrion, également sensibilisé dans les deux mélanges, a pu se développer dans le tube *a*, où l'on avait eu soin de faire dévier, au préalable, l'influence nuisible de l'alexine, en la faisant porter, à l'aide d'une sensibilisatrice appropriée, sur le *Proteus vulgaris:* ce microbe a servi, en quelque sorte, de bouclier au vibrion [2].

1. On s'assure, bien entendu, de ce que le vibrion cholérique, mélangé seulement au choléra-sérum préalablement chauffé à 56°, reste (à part l'agglutination) complètement intact; on procède au même contrôle pour ce qui concerne le Proteus et le Proteus-sérum.

2. C'est bien la démonstration formelle de cette notion, établie en 1895 par l'un de nous : «... Chez les animaux neufs ou vaccinés, la matière bactéricide est la même... Chez les animaux vaccinés respectivement contre certaines infections,

*
* *

Les exemples étudiés dans le présent article, venant s'ajouter à ceux que l'on possédait déjà, suffisent à conférer l'allure d'une loi générale à cette notion que, sous l'influence de la vaccination, l'organisme élabore une sensibilisatrice appropriée, pouvant provoquer spécifiquement l'absorption de l'alexine par le microbe qu'elle impressionne.

Nous n'aborderons nullement ici la question de savoir jusqu'à quel point la présence d'une sensibilisatrice dans l'un quelconque des sérums cités contribuerait à assurer la protection des animaux neufs, que l'on pourrait, dans un but préventif ou curatif, traiter par l'injection de ce sérum. Bornons-nous à faire remarquer que, logiquement, la part qui revient aux sensibilisatrices dans la protection de l'organisme doit varier beaucoup suivant les microbes que l'on considère. Certains d'entre eux se laissent détruire facilement dès qu'ils fixent l'alexine; d'autres, placés dans les mêmes conditions, résistent davantage (sans qu'on puisse, à la vérité, exclure la possibilité d'une altération, non morphologique, mais purement physiologique du microbe): certains, sans doute, absorbent impunément l'alexine[1]. Divers sérums thérapeutiques doivent une grande part de leur activité aux antitoxines qu'ils renferment. En outre, le siège de l'infection doit entrer en ligne de compte, puisque l'alexine n'est pas uniformément distribuée dans tout l'organisme. Il est certain que la part respective revenant, dans l'œuvre totale de la guérison par la sérothérapie, à chacune des substances que le sérum actif peut contenir, est sujette à grandir ou à diminuer, suivant qu'on étudie telle ou telle infection.

Il est un fait, maintes fois signalé plus haut, sur lequel nous reviendrons un instant. Dans les exemples soumis à l'étude, les microbes divers ne manifestent vis-à-vis de l'alexine qu'une

l'énergie de la substance bactéricide se fait sentir plus vivement contre tel microbe en particulier, et cela sous l'influence de la matière préventive spécifique (sensibilisatrice), variable suivant les cas, et dont la nature dépend de celle du microbe qui a servi à l'immunisation. C'est par l'intermédiaire de cette singulière substance, la matière préventive, que l'organisme *dirige son pouvoir destructif* spécialement contre un virus déterminé... » (Contribution à l'étude du sérum chez les vaccinés. *Annales de la Société des sciences naturelles et médicales de Bruxelles*, 1895.)

1. Nous espérons pouvoir rechercher bientôt si le sérum d'hommes tuberculeux contient une sensibilisatrice capable de faire absorber l'alexine par le bacille de Koch. Si l'expérience répond par l'affirmative, on aurait un exemple d'une sensibilisatrice impuissante, ne servant pas à grand'chose.

propriété fixatrice nulle ou à peine appréciable, lorsqu'ils ne sont pas sensibilisés, c'est-à-dire lorsqu'ils sont en présence de sérum neuf. D'autre part, même lorsque les microbes sont sensibilisés, il faut encore qu'ils soient assez nombreux pour absorber complètement toute l'alexine présente. On ne saurait guère admettre, en conséquence, que chez les animaux qui se laissent envahir et tuer par un microbe pathogène, la mort soit due à l'insuffisance de la dose d'alexine présente dans l'organisme. D'abord, en émettant une telle affirmation, on perdrait un peu trop de vue cette notion fondamentale, tant de fois démontrée, que lorsque l'organisme succombe à l'infection, c'est en toute première ligne parce que ses phagocytes ont été impuissants à englober le parasite, en ont permis le libre développement. Ensuite — même en supposant qu'une part tout à fait essentielle dans l'immunité revînt à l'influence protectrice de l'alexine, — il faudrait dire que ce qui fait défaut, ce n'est pas l'alexine, c'est l'absorption, c'est-à-dire l'utilisation de cette substance.

Aussi ne peut-on guère prévoir — ainsi que M. Wassermann en avait formulé l'espoir — que la thérapeutique des maladies microbiennes humaines puisse profiter beaucoup de la méthode curative qui recommande, outre l'administration du sérum spécifique, l'injection de sérum neuf (alexine) provenant de certaines espèces animales. On le peut d'autant moins, que l'alexine fournie par les espèces animales étrangères, injectée à dose assez forte, nuit non seulement aux microbes, mais aussi aux cellules de l'organisme même. Ce dernier se défend du reste bientôt contre de pareilles injections, par la production d'antidotes, les anti-alexines.

CONCLUSIONS

1° La production des sensibilisatrices spécifiques par les organismes vaccinés est un fait général. Les sensibilisatrices actives vis-à-vis des microbes les plus divers présentent ce caractère commun, de faire absorber l'alexine par les éléments qu'elles impressionnent.

2° La gravité du dommage causé aux microbes par l'absorption de l'alexine varie avec l'espèce microbienne considérée.

SUR LE MODE D'ACTION DES SÉRUMS CYTOLYTIQUES
ET SUR L'UNITÉ DE L'ALEXINE
DANS UN MÊME SÉRUM

PAR LE Dr JULES BORDET.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

On accepte unanimement aujourd'hui, comme entièrement démontrée, la notion que nous avons établie en 1895 pour ce qui concerne les sérums bactériolytiques tels que le choléra-sérum, en 1898 pour les sérums hémolytiques spécifiques, à savoir que la bactériolyse et l'hémolyse sont dues à l'action combinée de deux substances bien distinctes, l'une, l'alexine, matière cellulicide et bactéricide proprement dite, présente dans le sérum des animaux neufs et dans celui des organismes immunisés; l'autre, la substance sensibilisatrice spécifique, qui confère aux sérums de vaccinés leurs caractères particuliers, et dont le rôle est de favoriser considérablement, d'une manière spécifique, l'influence destructive de l'alexine. Dans un mémoire fait en collaboration avec le Dr Gengou et publié dans ce même numéro des *Annales*, nous rappelons au lecteur le procédé qui nous a permis de mettre en lumière l'existence de ces matières sensibilisatrices; le fait essentiel qui lui sert de base, c'est que le sérum bactériolytique (ou hémolytique) spécifique, chauffé au préalable à 55°, et privé ainsi de son énergie destructive propre, confère un pouvoir bactéricide (ou globulicide) très intense au sérum neuf alexique (sérum non chauffé) auquel on le mélange; nous montrons ensuite, grâce à l'emploi d'une méthode plus nouvelle, que de pareilles substances sensibilisatrices se rencontrent dans de nombreux, probablement dans tous les sérums antimicrobiens obtenus par l'immunisation artificielle.

Mais on ne peut se contenter de connaître ce fait primordial, que l'action destructive d'un sérum est due à la collaboration de l'alexine et de la sensibilisatrice. Il faut tenter d'aller plus loin, de découvrir le mécanisme intime du phénomène, de préciser la nature de la réaction qui s'effectue entre les éléments sensibles et les substances actives. Ce n'est que dans ces derniers temps, depuis 1899, que ce nouveau problème a été soumis à une investigation vraiment pénétrante; les données recueillies ne sont pas encore très nombreuses; néanmoins trois faits importants ont pu être solidement établis. Nous allons les énumérer, et rencontrer ensuite les interprétations auxquelles ces faits ont donné lieu.

§ I. — L'alexine se combine-t-elle a la substance sensibilisatrice?

Parmi ces trois faits, le premier concerne spécialement les sérums neufs. Lorsqu'on mélange des globules rouges avec une certaine dose d'un sérum neuf d'espèce différente, on constate, dans de nombreux exemples, que l'hémolyse ne se produit que faiblement. Dans le cas surtout où le contact n'est pas trop prolongé, un grand nombre de globules restent intacts. Séparons ensuite ces globules, lavons-les pour les débarrasser du sérum neuf où ils baignaient, et mélangeons-les à de la sensibilisatrice, c'est-à-dire à du sérum hémolytique spécifique, actif contre ces hématies, et qui a été préalablement chauffé à 55°. L'hémolyse n'apparaît pas. Cette expérience a été réalisée par MM. Ehrlich et Morgenroth [1]. Elle montre que les globules (non sensibilisés), mêlés au sérum neuf, n'en ont pas absorbé l'alexine, car on savait antérieurement qu'en présence d'alexine les hématies se détruisent dès qu'on ajoute la sensibilisatrice appropriée. Ce fait que les hématies (en l'absence de la sensibilisation spécifique) ne fixent nullement l'alexine d'un sérum neuf, n'est exact que pour celles qui se conservent intactes dans ce dernier liquide, mais ne l'est pas pour celles qui s'y détruisent. On connaît des exemples de sérums neufs qui manifestent une énergie hémolytique très grande vis-à-vis de certaines races d'hématies. Ainsi, le sérum de poule détruit avec beaucoup d'activité les globules de lapin [2]. Ceux-ci, mis en présence de

1. *Berliner Klin. Wochenschrift*, n° 1, 1899.
2. Bordet, ces *Annales*, 1898.

ce sérum neuf hémolysant, en absorbent l'alexine d'une manière très notable. Si l'on ajoute au mélange (de sérum de poule et d'une dose suffisante de globules de lapin) où l'hémolyse s'est effectuée, de nouveaux globules de lapin, ceux-ci restent intacts [1].

De ces deux expériences, nous pouvons conclure qu'en présence de sérum neuf, les globules ne touchent pas à l'alexine quand ils restent intacts, en absorbent une certaine dose lorsqu'ils se détruisent.

Les deux autres faits sont relatifs aux sérums hémolytiques spécifiques, obtenus en traitant les animaux par des injections de sang défibriné ;

2°) Lorsqu'on mélange un sérum hémolytique, préalablement chauffé à 55°, avec les globules que ce sérum peut impressionner, ces *hématies absorbent énergiquement la sensibilisatrice*, et en dépouillent le liquide ambiant. Ce fait a été pour la première fois démontré d'une manière irréfutable par MM. Ehrlich et Morgenroth [2] ;

3°) Le troisième fait, que nous avons établi il y a environ un an [3], est le suivant : si l'on mélange à du sérum neuf non chauffé (sérum alexique) des globules ou des microbes impressionnés par la sensibilisatrice appropriée (en d'autres termes par un sérum hémo ou bactériolytique qu'on a chauffé à 55°), *ces éléments sensibilisés absorbent l'alexine, dont ils subissent l'influence destructive, et la font disparaître du liquide.* Cette fixation peut s'effectuer d'une manière tellement complète, que le liquide *perd entièrement* le pouvoir de nuire à de nouveaux éléments quelconques (globules ou microbes), même fortement sensibilisés, que l'on peut y introduire ultérieurement.

Tels sont, en dehors de toute théorie, les faits principaux qui ressortent nettement des expériences. Examinons maintenant les conceptions qui, tenant compte de ces faits, tentent de

1. Ils restent intacts encore lorsqu'on ajoute ensuite à ce mélange du sérum de poule préalablement chauffé à 55°. Ceci montre que c'est bien l'alexine qui a été absorbée. On aurait pu objecter, en effet, que les globules introduits en premier lieu, et qui se sont détruits, n'ont guère absorbé l'alexine, mais ont fixé une sensibilisatrice normale, existant dans le sérum de poule, et dont le concours est nécessaire à l'hémolyse ; si tel eût été le cas, l'addition de sérum chauffé à 55° eût restitué au liquide, au moins en partie, ses propriétés destructives.

2. *Berliner klin. Wochenschr.* n° 1, 1899.

3. Ces *Annales*, mai 1900.

préciser les réactions qui s'effectuent entre les éléments sensibles et les substances actives.

D'après MM. Ehrlich et Morgenroth, l'anticorps spécifique (sensibilisatrice) joue le rôle d'un véritable corps intermédiaire (Zwischenkörper, Amboreceptor), de trait d'union s'attachant d'une part au globule, d'autre part à l'alexine. En d'autres termes, l'absorption que l'alexine subit en présence du globule sensibilisé n'est pas due à une affinité manifestée par le globule lui-même à l'égard de cette substance. L'absorption de l'alexine par le globule n'est qu'indirecte : l'hématie s'unit à la substance intermédiaire, qui s'unit elle-même chimiquement, par un autre pôle, à l'alexine.

L'idée que nous avions cru pouvoir nous faire du phénomène est toute différente. Pour nous, la sensibilisatrice qui s'unit à l'hématie modifie celle-ci de manière à lui permettre d'absorber directement l'alexine. L'action de la sensibilisatrice sur les éléments cellulaires serait donc comparable à celle de certains agents fixateurs ou mordançants, lesquels confèrent à certaines substances (ou à des cellules, comme c'est le cas dans la technique histologique) la propriété d'absorber des couleurs qu'elles refusaient auparavant. On le sait, il suffit souvent de modifications assez légères pour que des cellules puissent se teindre par des réactifs colorants qui, à l'état normal, n'ont point prise sur elles. Bien entendu, quand nous parlons de mordançage, nous ne prétendons pas qu'il faille assimiler entièrement, jusque dans les détails, les phénomènes de teinture avec ceux qui nous intéressent ici ; nous nous bornons à évoquer une comparaison destinée à rendre l'idée plus claire. L'hypothèse que nous désirons mettre en relief, c'est qu'en présence du sérum hémolytique, le globule deviendrait capable d'absorber directement l'alexine par son affinité propre, et que l'apparition de ce pouvoir fixateur reconnaitrait pour cause une modification apportée à l'hématie par la sensibilisatrice. En d'autres termes, nous ne croyons pas qu'on soit forcé d'admettre, comme le font MM. Ehrlich et Morgenroth, que la sensibilisatrice se combine elle-même à l'alexine, et que cette union soit indispensable pour que cette dernière substance puisse atteindre le globule rouge.

Il convient de faire remarquer que les deux interprétations

ci-dessus résumées sont purement hypothétiques, et n'ont reçu jusqu'ici la sanction d'aucun fait vraiment probant. Il y a lieu de vérifier jusqu'à quel point l'une ou l'autre de ces hypothèses est conforme à la réalité ; à cet effet, on peut rechercher si les conséquences qui découlent forcément de ces conceptions se trouvent d'accord avec l'expérience.

Considérons un sérum hémolytique, récemment obtenu et non chauffé, qui contient donc de l'alexine et une substance sensibilisatrice. D'après MM. Ehrlich et Morgenroth, cette sensibilisatrice est combinée à l'alexine — sinon à la totalité (car le sérum pourrait contenir un excès de cette dernière substance) au moins à une fraction plus ou moins importante de cette matière. Quand on introduit les globules, la sensibilisatrice s'unit à ces éléments, entraînant à sa suite l'alexine qu'elle avait, antérieurement déjà, fixée par son autre pôle. La portion d'alexine qui pourra détruire les globules sera donc, exclusivement, celle dont la sensibilisatrice se sera emparée au préalable. S'il existait par hasard, dans le sérum, une quantité d'alexine supérieure à celle que nécessite la saturation de la sensibilisatrice, cet excès n'agirait point sur les globules et resterait par conséquent inutilisé. Nous pouvons donc conclure que le globule introduit *est incapable de modifier en quoi que ce soit les relations qui se sont établies entre l'alexine et la sensibilisatrice ;* il se borne à fixer cette dernière et à se laisser détruire par l'alexine que ce corps intermédiaire s'est attachée au préalable.

Or, si dans un pareil sérum hémolytique, non chauffé, actif par exemple contre les globules de lapin, nous introduisons (avant d'ajouter aucun globule) une sensibilisatrice (c'est-à-dire un sérum hémolytique chauffé au préalable à 55°) active contre un globule différent, tel que le globule de poule, que va-t-il se passer ? Disons tout de suite que, comme on le suppose bien, le mélange obtenu peut détruire indifféremment les hématies de poule et celles de lapin. Il faut donc admettre, d'après la théorie de MM. Ehrlich et Morgenroth, que les deux sensibilisatrices sont entrées en conflit pour se partager l'alexine ; une certaine portion de celle-ci s'est unie à la sensibilisatrice A, l'autre à la sensibilisatrice B. Introduisons maintenant les globules impressionnables par la sensibilisatrice A ; il est clair que ces hématies vont absorber cette dernière, et ressentiront l'influence nocive

de l'alexine unie à ce corps intermédiaire A. Mais il n'y a (toujours d'après la théorie dont nous suivons fidèlement les conséquences) aucune raison pour que ces globules soient attaqués par l'autre portion d'alexine, unie à la deuxième sensibilisatrice, à laquelle ils sont insensibles et ne se combinent point. Il en résulte que si nous introduisons ultérieurement la seconde espèce d'hématies, celles-ci doivent se détruire à leur tour, car la sensibilisatrice B, qu'absorbent ces nouveaux globules, leur aura réservé, en se l'attachant, la part d'alexine qui leur revient.

Or, l'expérience infirme complètement ces déductions théoriques, auxquelles la conception de MM. Ehrlich et Morgenroth nous conduit. Préparons deux mélanges A et B, exactement semblables, comprenant tous deux 2/10 de c. c. de sérum hémolytique, récemment obtenu et non chauffé (provenant d'un cobaye traité antérieurement par 4 injections de 4-5 c. c. de sang de lapin), et 1 c. c. de sérum, préalablement chauffé à 56°, provenant d'un lapin traité par le sang de poule. On additionne le mélange A de 6/10 de c. c. de sang défibriné de poule (préalablement lavé à l'eau physiologique) ; ces globules se détruisent bientôt. Quant au mélange B, on n'y introduit rien à ce moment.

Quelques heures plus tard, on ajoute, à chacun des deux mélanges, 2 gouttes de sang défibriné de lapin. Dans le mélange B, ces hématies sont entièrement détruites au bout de 3/4 d'heure environ. Il y a donc, dans ce mélange, une dose notable d'alexine capable de détruire activement ces globules de lapin ; il faudrait admettre que cette portion d'alexine s'était combinée à la sensibilisatrice qui impressionne ces hématies. Le second mélange va nous montrer qu'il n'en est rien.

Dans le mélange A, identique à la mixture B, sauf qu'il contient, en plus, les globules de poule déjà détruits, les hématies de lapin restent intactes ; on les retrouve encore le lendemain de l'expérience, au milieu des noyaux, libérés de leur protoplasme, des globules de poule[1]. Ceux-ci ont donc consommé entièrement l'alexine. Il faut en conclure, par consé-

1. La destruction des hématies de lapin n'apparaît que si l'on ajoute un supplément d'alexine, sous forme de sérum de cobaye neuf; ces éléments s'altèrent alors rapidement, montrant ainsi qu'ils avaient bien absorbé leur sensibilisatrice appropriée.

quent, conformément à la thèse des auteurs cités, que la sensibilisatrice active contre les globules de poule s'était combinée à la totalité de l'alexine, empêchant ainsi l'autre sensibilisatrice (active contre les hématies de lapin) de s'en attribuer une certaine part. Cette conclusion est évidemment valable aussi pour le mélange B, composé des mêmes doses des mêmes sérums. Or, dans ce mélange B, cette sensibilisatrice qui impressionne les globules de lapin et qui ne s'était combinée à aucune dose d'alexine, a pu néanmoins présider à la destruction de ces hématies. En conséquence, il n'est nullement nécessaire d'admettre, pour expliquer l'hémolyse, que la sensibilisatrice se combine avec l'alexine. Il ressort au contraire de cette expérience que, conformément à notre manière de voir, le globule modifié par son union avec la sensibilisatrice absorbe lui-même, directement, la matière globulicide, et l'empêche ainsi d'agir sur de nouveaux éléments. En l'absence de ce globule, la présence de cette sensibilisatrice elle-même ne lie en rien l'alexine, ne la détourne nullement de se fixer sur le premier élément quelconque, traité par une sensibilisatrice appropriée, qu'on lui offre. Il est donc opportun de renoncer à ces appellations de *Zwischenkörper*, *Amboreceptor*, *Complement*, termes dont on a fait choix sous l'empire d'idées théoriques sûrement ingénieuses, capables, par les expériences qu'elles ont inspirées, de faire avancer la science, mais que l'expérience ne justifie point[1].

L'expérience relatée ci-dessus est du reste tout à fait semblable à celles que nous avons relatées antérieurement dans ces *Annales*. Nous nous bornons aujourd'hui à insister davantage sur les conclusions qui s'en dégagent ; en outre, nous avons

1. L'expérience ci-dessus résumée comporte encore un troisième mélange C. Ce dernier contient, comme les autres, 2/10 de c. c. de sérum hémolytique non chauffé, actif contre les globules de lapin. Mais il renferme, au lieu de sérum de lapin (chauffé à 56°) actif contre le sang de poule, une dose correspondante (1 c. c.) de sérum (chauffé à 56°) de *lapin neuf*. Ce mélange est additionné de 6/10 de c. c. de sang de poule, qui ne s'y détruit pas; on y verse ultérieurement (comme dans les deux autres) 2 gouttes de sang de lapin. Ces globules se détruisent avec la même rapidité que dans le mélange B. Les mélanges B et C se comportant de même, on conclut que la sensibilisatrice active contre les globules de poule, et les globules de poule eux-mêmes, sont, isolément, incapables de s'emparer de l'alexine. Pour que l'absorption se produise, il faut que ces deux éléments soient réunis. Des globules différents, qui ne seraient pas impressionnés par la sensibilisatrice mise en œuvre, laisseraient, bien entendu, l'alexine complètement libre, ainsi que nous l'avons montré (ces *Annales*, 1900) dans une expérience analogue.

jugé utile de la répéter sous différentes formes, afin de montrer qu'elle conduit, dans les divers cas, à des résultats identiques.

Par exemple, mélangeons 5/10 de c. c. de sérum frais de cobaye neuf, non chauffé, à 2, 5 c. c. de sérum (chauffé au préalable à 56°) de cobaye traité par des injections de sang de lapin, et à 2,5 c. c. de sérum (chauffé à 56°) de cobaye traité par des injections de sang de poule. On établit que 5/10 de c. c. de ce mélange (qui contient un seul sérum alexique et deux sensibilisatrices) détruit entièrement 1/10 de c. c. de sang défibriné de poule (préalablement lavé à l'eau physiologique). Mais ce 1/10 de c. c. de sang de poule reste indéfiniment intact dans une quantité au moins double, 2/10 de c. c. (contenant donc au moins le double d'alexine et de sensibilisatrice) de ce même mélange, si ces 2/10 de c. c. ont été additionnés au préalable de 3/10 de c. c. de sang de lapin (préalablement lavé). Ces globules de lapin se sont rapidement détruits, en absorbant toute l'alexine présente, sans que la sensibilisatrice active contre le sang de poule ait pu se réserver une part de cette substance.

On peut aussi, en partant d'un mélange semblablement composé (5/10 de c. c. de sérum de cobaye neuf, non chauffé, 2, 5 c. c. de sérum chauffé de cobaye actif contre les globules de lapin, 2,5 c. c. de sérum chauffé de lapin actif contre le sang de poule) faire l'épreuve inverse. Le mélange est divisé en parts égales. Dans l'une des parts, on introduit d'abord le globule A, puis, quelques heures plus tard, le globule B. Dans une autre part, on ajoute d'abord B, puis A. On constate, comme dans les expériences précédentes, que le fait d'avoir introduit la première race de globules met obstacle à la destruction de la seconde espèce. Bien entendu, des témoins montrent que la dose, introduite en second lieu, de chacun des globules, se détruit rapidement dans des volumes même plus faibles du mélange (moitié moindres) lorsque ces volumes n'ont pas subi de contact préalable avec l'autre espèce d'hématies.

Les expériences faites en collaboration avec M. le Dr Gengou, et relatées dans ce même numéro des *Annales*, sont également très démonstratives pour la question qui nous intéresse ici. Elles montrent qu'on peut mélanger au sérum alexique une

sensibilisatrice active contre un microbe quelconque, sans que cette alexine éprouve la moindre difficulté à détruire des globules (ou des microbes différents) que l'on impressionne par des sensibilisatrices non identiques à la première, et que l'on introduit ultérieurement. Au contraire, le pouvoir alexique du liquide disparaît entièrement si la sensibilisatrice antimicrobienne, mélangée en premier lieu, est accompagnée du microbe sur lequel elle agit spécifiquement. Ici encore, c'est bien le microbe sensibilisé lui-même, et non la sensibilisatrice, qui s'empare de l'alexine.

Nous devons maintenant lever une objection opposée à notre manière de voir par MM. Ehrlich et Morgenroth. Ces savants considèrent que d'après notre conception, on doit admettre qu'un globule sensibilisé devra ressentir au même degré l'influence destructive de toutes les alexines (fournies par les différentes espèces animales). Or, pour provoquer la destruction des globules de lapin par l'alexine de lapin[1], il faut les sensibiliser beaucoup plus fortement (en d'autres termes il faut les additionner d'une dose beaucoup plus forte de sérum hémolytique préalablement chauffé à 55°, provenant d'animaux traités par le sang de lapin) que pour en provoquer l'hémolyse sous l'influence de l'alexine de cobaye.

Ce fait est exact ; nous l'admettons d'autant mieux que nous l'avons mentionné nous-même[2] dans l'article qui a suggéré l'objection de MM. Ehrlich et Morgenroth. Mais ce qui se conçoit avec difficulté, c'est la supposition de ces savants, à savoir que d'après notre conception, des globules sensibilisés devraient subir, avec la même intensité, l'action destructive des diverses alexines. Notre manière de voir présume exactement le contraire. Comme les alexines des différentes espèces animales ne sont pas identiques entre elles, il est tout naturel qu'elles ne manifestent pas toutes une tendance également forte à détruire un globule déterminé. Par suite, il suffira parfois d'une faible sensibilisation pour qu'un globule ressente l'influence de certaines alexines. Pour que d'autres alexines, moins nocives,

1 Nous avons noté, dans notre premier mémoire sur l'hémolyse (1898), que les globules de lapin se détruisent non seulement par les alexines d'animaux différents, mais aussi sous l'influence de l'alexine du même animal, lorsqu'ils sont sensibilisés.

2. Ces *Annales*, 1900, page 259.

produisent le même effet, une sensibilisation plus énergique sera nécessaire. Dans le cas étudié, on conçoit bien facilement que les hématies de *lapin* doivent être fortement sensibilisées, pour céder à l'influence de l'alexine de *lapin*, laquelle, dans les conditions normales, est entièrement inoffensive pour les globules du même animal. Le lecteur conçoit donc facilement qu'une même dose de la même sensibilisatrice semblera impressionner un même globule rouge avec une énergie bien différente, suivant la nature de l'alexine à laquelle elle est associée. La sensibilisatrice, dans ces différents cas, sera toujours identique à elle-même ; mais la *dose* de cette matière qu'il faudra mettre en œuvre *varierа avec la provenance de l'alexine* qu'on fait intervenir.

Eh bien, de ce fait que la dose nécessaire de sérum sensibilisateur change avec la nature de l'alexine mise en jeu (fait qui s'explique, ainsi que nous venons de le voir, de la manière la plus naturelle), MM. Ehrlich et Morgenroth croient pouvoir conclure que ce sérum renferme plusieurs sensibilisatrices actives contre les globules de lapin, mais qui sont différentes. L'une de ces matières rendrait le globule de lapin sensible à l'alexine de cobaye, l'autre à l'alexine de lapin. C'est là compliquer beaucoup, sans nécessité urgente, la question déjà assez embrouillée des sérums hémolytiques [1].

§ II. — Sur l'unité de l'alexine dans un même sérum.

On sait déjà que les alexines fournies par les différentes espèces animales ne sont pas identiques. Mais un même sérum alexique, tel que le sérum de cobaye neuf, contient-il une seule alexine, ou bien en renferme-t-il plusieurs, de constitution chimique différente? Posée sous cette forme, cette question ne pourrait que difficilement recevoir une réponse précise, nos notions sur la nature chimique de l'alexine étant à peu près nulles. Il est plus opportun de se demander si l'alexine d'un sérum est sinon chimiquement, au moins fonctionnellement

1. Par des raisonnements similaires, MM. Ehrlich et Morgenroth considèrent qu'il y a, dans un même sérum *neuf*, plusieurs corps intermédiaires (sensibilisatrices) différents, actifs contre les *mêmes* globules, mais qui ont besoin, pour les détruire, d'être associés à des alexines (compléments) différentes.

unique, c'est-à-dire si l'alexine (ou chacune des alexines, si l'on tient à ce qu'il y en ait plusieurs) peut attaquer indifféremment les divers éléments, globules, microbes (spécialement les éléments sensibilisés) qu'on lui offre. Formulée de la sorte, la question présente un réel intérêt pour les études relatives à l'immunité, et peut, en outre, être résolue plus facilement.

On sait que M. Buchner, dès les premières recherches[1], aujourd'hui classiques, qu'il a faites sur l'alexine des sérums normaux, a émis l'idée que la substance qui détruit les microbes est identique à celle qui produit l'hémolyse. Nous avons apporté, il y a un an, en faveur de cette idée, des faits qui nous paraissaient démonstratifs.

Ces faits ont été rappelés dans le cours du présent article. Lorsqu'on dépouille un sérum de son alexine en y mêlant un microbe (ou un globule) sensibilisé déterminé, le liquide se montre désormais incapable de détruire un nouvel élément sensibilisé, même si ce dernier est très différent de celui, introduit en premier lieu, qui s'est emparé de l'alexine. C'est donc toujours la même alexine qui intervient pour détruire les éléments les plus divers, et se fixer sur eux. Dans le travail publié en collaboration avec M. le Dr Gengou, on voit que les microbes les plus variés absorbent l'alexine nécessaire à la destruction d'hématies ou de microbes différents.

Nous citerons encore deux exemples analogues. Le spirille rouge, microbe non pathogène, dégénère très facilement, même en l'absence d'une sensibilisatrice spécifique, lorsqu'on le mélange à du sérum de cobaye qui n'a jamais reçu d'injections de ce microbe. Disposons dans deux tubes 2/10 de c. c. de sérum hémolytique récemment obtenu, provenant de cobayes traités antérieurement par le sang de lapin. Dans le tube *a*, on ajoute 3/10 de c. c. de sang de cobaye; dans le tube *b*, 3/10 de c. c. de sang de lapin (ces globules ont été lavés à la solution physiologique). Au bout de quelque heures, ajoutons à chaque tube une petite quantité (2 gouttes) d'émulsion de spirilles, et portons le mélange à l'étuve. On constate que ces spirilles dégénèrent dans le tube *a*, où les globules (de cobaye) sont restés intacts; les spirilles sont normaux dans le tube *b*, où les globules (de lapin)

1. Voir, par exemple : *Verhandlungen des Congresses für Innere Medicin*, 1892.

s'étaient rapidement détruits. Cette constatation faite, on ajoute aux deux tubes la même dose de sang de poule fortement sensibilisé; ces globules s'hémolysent dans le tube *a*, se conservent intacts dans *b*. Donc les globules de lapin, en absorbant l'alexine, ont protégé deux éléments très différents, le spirille et l'hématie de poule.

Un autre exemple vise un cas assez particulier. On peut se demander si l'alexine de lapin, qui attaque les globules de même espèce lorsqu'ils sont sensibilisés, est identique à celle, présente aussi dans le sérum de lapin, qui détruit les hématies provenant d'espèces différentes. L'expérience répond par l'affirmative. On dispose, dans deux tubes *a* et *b*, 2/10 de c. c. de sang de poule lavé à la solution physiologique; on ajoute à chacun des tubes 2/10 de c.c. de sérum, non chauffé, de lapin neuf. On additionne le tube *a* de 6/10 de c. c. de sérum (préalablement chauffé à 56°) provenant d'un lapin traité par le sang de poule. Le tube *b* reçoit 6/10 de c.c. de sérum (préalablement chauffé à 56°) de lapin neuf. Les globules de poule s'hémolysent dans *a*, restent intacts dans *b*. Au bout de quelques heures, on ajoute à chaque mélange 2/10 de c.c. d'un mélange ainsi constitué: 20 gouttes de sang de lapin (lavé à l'eau physiologique), 2 c. c. de sérum (chauffé à 56°) de cobaye traité par le sang de lapin. — Ces globules sensibilisés se détruisent dans *b*, se conservent intacts dans *a*.

La thèse qu'une même alexine peut s'attaquer aux éléments les plus divers nous paraît suffisamment démontrée par l'ensemble de ces expériences[1]. Nous devons néanmoins lever certaines objections, dont quelques-unes paraissent assez graves, qui ont été opposées à cette manière de voir.

MM. Ehrlich et Morgenroth, ayant chauffé à 56°, ou même à des températures plus élevées, du sérum de bouc antérieurement traité par des injections de sang de mouton, constatent que ce sérum a entièrement perdu le pouvoir de détruire diverses espèces de globules, tels que ceux de cobaye, de lapin, qu'il attaquait auparavant. Ce qui disparaît donc, c'est la propriété hémolytique non spécifique, s'exerçant à l'égard d'hématies qui

1. Elle est en harmonie aussi avec ce fait, établi par nous antérieurement, qu'un sérum antialexique, qui neutralise l'alexine du sérum d'une certaine espèce animale, protège contre cette alexine les éléments les plus divers (globules, vibrion cholérique), même fortement sensibilisés. (Ces *Annales*, mai 1900.)

ne sont pas intervenues dans le traitement de l'animal, propriété que le sérum de bouc normal possède également. Mais ce sérum de bouc, traité par le sang de mouton, présente encore très nettement, malgré le chauffage, la faculté de détruire les hématies de mouton contre lesquelles il est spécifiquement actif. MM. Ehrlich et Morgenroth concluent que le sérum étudié possède des alexines différentes, les unes détruites à 56°, les autres qui résistent à cette température. On peut tout aussi bien admettre qu'il s'agit toujours de la même alexine, et que cette substance n'a été que modifiée, atténuée par le chauffage. L'altération suffit pour que cette substance ne puisse plus provoquer l'hémolyse, déjà faible à l'origine, qu'elle faisait auparavant subir aux globules *non sensibilisés;* mais cette matière est encore capable d'atteindre les globules que la sensibilisation spécifique, opérée par le même sérum, rend plus facilement destructibles.

Dans une autre expérience, MM. Ehrlich et Morgenroth filtrent (*Pukallfilter*) un sérum de chèvre normale, sérum qui, à l'origine, détruisait les globules de lapin et ceux de cobaye. Après la filtration, le sérum détruit encore très nettement les globules de cobaye, mais il laisse intacts les globules de lapin. D'après les auteurs, l'une des alexines a été retenue sur le filtre, l'autre a passé : ceci implique que les deux alexines actives vis-à-vis des deux races de globules doivent présenter des différences chimiques bien marquées, pour se comporter aussi diversement en présence d'un même filtre. Notons qu'il s'agit ici d'hémolyse par sérum normal, c'est-à-dire d'un phénomène peu intense, qui peut être influencé par des causes assez minimes. L'expérience montre bien que le sérum, après filtration, ne possède plus toute l'alexine qu'il contenait auparavant ; elle ne nous force point à admettre qu'il y ait deux alexines distinctes. On doit se demander en effet si la filtration, en enlevant au sérum certains de ses éléments, n'en a pas modifié les propriétés physiques, en le rendant moins favorable à la conservation des globules ; on concevrait ainsi que certaines espèces d'hématies, plus sensibles que d'autres aux qualités physiques du milieu ambiant, céderaient dès lors plus facilement à l'influence de traces d'alexine. Quoi qu'il en soit, du reste, cette expérience, qui ne fait pas intervenir la sensibilisation par un

sérum spécifique, n'infirme nullement notre thèse, à savoir que la même alexine peut détruire, avec beaucoup d'énergie, les éléments sensibilisés les plus divers[1].

M. Neisser[2], qui est partisan de la pluralité des alexines dans un même sérum, s'appuie sur diverses expériences réalisées les unes par M. Bail[3], les autres par lui-même, et dont le principe est le suivant : si l'on met en contact un sérum neuf avec un élément A (microbe, globule), et qu'après un contact assez prolongé on centrifuge, on constate que le sérum surnageant a perdu le pouvoir d'altérer l'élément A. mais détruit encore bien des éléments différents B ou C. Donc, conclut M. Neisser, l'alexine qui atteint A n'est pas identique à celle qui attaque B ou C.

L'expérience, et par suite la conclusion qui en découle, présente une cause d'erreur très importante. Dans la grande majorité des cas, les éléments (non sensibilisés) placés même en grande dose au contact d'un sérum *neuf*, n'absorbent qu'une quantité faible d'alexine. Nos diverses expériences relatées plus haut, ainsi que celles faites en collaboration avec M. Gengou, le prouvent clairement. Dans de telles conditions. le liquide conserve en conséquence le pouvoir de détruire très activement les éléments sensibilisés qu'on introduit ultérieurement. On est autorisé à admettre que si l'on met un élément non sensibilisé (ou qui ne l'est que faiblement). tel que des globules rouges d'espèce A, au contact d'un sérum neuf, il s'établit bientôt un état d'équilibre, un partage de l'alexine entre l'élément et le liquide, celui-ci gardant la majeure partie de l'alexine. Aussi l'hémolyse ne dépasse-t-elle pas un certain degré. Il est même fort possible, en outre (c'est une hypothèse vraisemblable), que les globules détruits mettent en liberté quelque chose qui gêne l'action ultérieure du liquide sur cette même race d'hématies, sans mettre obstacle à l'influence nocive de ce même liquide sur une autre espèce de globules rouges. Ainsi, l'état d'équilibre réalisé pour le globule A pourrait bien n'être nullement établi pour

1. En effet, l'expérience ne nous dit pas si le sérum filtré eût été incapable de détruire d'une manière semblable soit l'un, soit l'autre des deux globules, sensibilisés au préalable par le sérum spécifique (chauffé à 56°) approprié.

2. Ueber die Vielheit der im normalen Serum vorkommenden Antikörper, *Deustche med. Wochenschr.*, 1900, n° 49.

3. *Archiv für Hygiene*, 1899, Bd. XXV

un élément différent, ultérieurement ajouté, ce dernier pouvant en conséquence s'altérer dans le liquide.

Il résulte de ces considérations que si l'on mélange une certaine dose de sérum neuf (par exemple 3 c. c. de sérum de cobaye neuf, avec une quantité même très forte de sang défibriné (telle que 6 c. c. de sang de lapin[1]), on n'a nullement le droit de dire que, même à la faveur d'un contact prolongé (seize heures), ces globules dépouilleront le liquide de la totalité de l'alexine capable d'attaquer ces mêmes hématies de lapin. Et cependant l'on constate que le liquide centrifugé, et qui est fortement rougi[2], laisse complètement intacts les nouveaux globules de lapin que l'on y introduit; il est devenu inactif pour ces hématies: d'autre part, on constate qu'il détruit encore visiblement des hématies différentes, telles que celles de poule.

Ce qu'on peut affirmer, c'est que le liquide contient encore une dose bien notable d'alexine, — d'où résulte la destruction des globules de poule. D'autre part, pour ce qui concerne les globules de lapin, il s'est établi un état d'équilibre dans la répartition de l'alexine (état dans lequel intervient peut-être aussi l'accumulation des produits de destruction de ces hématies), et qui prévient toute attaque ultérieure de ces mêmes éléments.

Rien de plus aisé en effet que de rompre cet état d'équilibre : il suffit d'augmenter, par la sensibilisation, l'avidité des globules de lapin pour l'alexine. Le liquide rouge que nous considérons (et qui a été longtemps en contact avec un excès de globules de lapin) détruit avec beaucoup d'énergie de nouveaux globules, préalablement sensibilisés, de même espèce. Ainsi, l'hémolyse s'effectue rapidement et complètement si l'on mélange 2/10 de c. c. de ce liquide rouge avec *volume égal* de sang défibriné de lapin (soigneusement lavé au préalable) et si l'on ajoute, en outre, 6/10 de c. c. de sérum, qui a été chauffé à 56°, de cobaye traité par le sang de lapin. Pour compléter l'expérience, préparons un mélange entièrement semblable au précédent, sauf qu'il renferme, au lieu de sérum sensibilisateur, 6/10 de c. c. de sérum de cobaye neuf, préalablement chauffé à 56°. Ici, les globules de lapin ne se détruisent naturellement pas. Quelques

1. Ce sang a été soigneusement lavé : on le mélange avec un grand excès de solution physiologique; on centrifuge, on aspire tout le liquide surnageant, en ne laissant que les globules; cette opération est faite à deux reprises.

2. Il contient néanmoins encore un grand nombre d'hématies de lapin intactes.

heures plus tard, introduisons dans les deux mélanges 3/10 de c. c. de sérum spécifiquement actif contre le sang de poule (et qui a été chauffé à 56°) et 1/10 de c. c. de sang défibriné de poule, bien lavé au préalable. Ces hématies de poule se détruisent rapidement dans le second mélange, restent entièrement intactes dans le premier.

Donc le sérum neuf alexique est loin d'être entièrement épuisé par un long contact préalable avec un excès de globules de lapin; il conserve une forte dose d'alexine parfaitement apte à attaquer ces mêmes globules. Lorsque ces derniers sont sensibilisés, l'absorption de l'alexine se fait avec une énergie infiniment plus grande, et des hématies nouvelles, de race différente, ultérieurement introduites, ne s'altèrent pas dans le liquide.

La critique que nous venons de faire des expériences relatées par M. Neisser comporte une indication: c'est qu'il faut émettre avec beaucoup de prudence et de réserve les conclusions qui paraissent résulter d'expériences similaires, où l'on met en jeu les sérums neufs : on admet en général trop hâtivement la multiplicité des substances actives dans ces sérums normaux. Il nous est d'autant mieux permis de faire cette remarque, qu'elle s'applique peut-être aussi à certaine expérience réalisée par nous antérieurement (multiplicité des agglutinines dans un même sérum de cheval neuf). Toutefois, le sujet est trop obscur encore pour qu'il nous soit possible d'émettre à ce propos une opinion précise relativement aux substances autres que les alexines.

Aussi, dans le présent chapitre, avons-nous abordé exclusivement la question de l'unité ou de la pluralité de l'*alexine* (complément de MM. Ehrlich et Morgenroth) dans un même sérum. Nous n'avons du reste nullement cherché à infirmer cette notion (qui ressort de certaines expériences réalisées surtout par MM. Ehrlich et Morgenroth[1]), que les sérums *neufs* pourraient bien contenir, outre l'alexine (complément), une, peut-être même plusieurs sensibilisatrices normales (beaucoup moins puissantes à la vérité que celles des sérums spécifiques), et dont le rôle serait encore de favoriser l'action de l'alexine.

1. Ces expériences sont du reste d'accord avec celle que nous avons faite (ces *Annales*, avril 1899) et qui dénote l'existence d'une matière présente dans le sérum de cheval neuf, et qui sensibilise à un certain degré le vibrion cholérique à l'égard de l'alexine d'un autre sérum normal.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES HÉMATOZOAIRES ENDOGLOBULAIRES DES REPTILES

PAR LE Dr P. L. SIMOND

I

ESPÈCES CONNUES DE REPTILES DONT LES GLOBULES SANGUINS RENFERMENT DES HÉMATOZOAIRES

Danilewsky (86 et 89) a fait connaître en 1883 l'existence d'hématozoaires endoglobulaires chez une tortue d'eau douce *Emys orbicularis* (*E. lutaria*), et chez deux lézards, *Lacerta muralis* et *Lacerta agilis*. Il a indiqué leur proche parenté avec les parasites endoglobulaires des Batraciens découverts par Ray Lankester et, pour bien marquer leurs affinités avec les grégarines, il a donné le nom de *Hæmogregarina* à ce nouveau genre. Laveran, à la suite d'études récentes, y a fait rentrer les hématozoaires endoglobulaires des Batraciens, ancien genre *Drepanidium*.

Les recherches postérieures ont montré que les parasites du genre *Hæmogregarina* n'étaient pas rares dans le sang de Reptiles appartenant à divers ordres : Labbé (94) en a signalé chez deux lézards : *Lacerta ocellata* et *Lacerta viridis* ; Billet (95) chez trois Ophidiens : *Python reticulatus*, *Tropidonotus stolatus*, *Bungarus fasciatus* ; chez une tortue : *Trionyx stellatus*, et chez un Saurien : *Platydactylus mauritanicus* (Billet 1900) ; Hagenmuller (98) chez un Ophidien, *Macroprotodon cucullatus* ; L. Pfeiffer (91) chez une tortue : *Testudo marginata* ; Adolphe Lutz (1901) chez onze espèces de serpents : *Eunectes murinus*, *Boa constrictor*, *Drymobius bifossatus*, *Coluber corais*, *Spilotes pullatus*, *Xenodon Neuwiedii*, *Rhadianaca Moremii*, *Philodryas Olfersii*, *Herpetodryas carinata* et deux espèces américaines des genres *Crotalus* et *Bothrops* ; Langmann (99) chez onze serpents : *Ankistrodon piscivorus*, *Ankistrodon contortrix*, *Crotalus adamantus*, *Crotalus confluentus*, *Elaps fulvius*, *Eutainia sirtalis*, *Eutainia saurita*, *Tropidonotus fasciatus*, *Corallus Cookei*, *Lampropeltis getulus*, *Spilotes Couperi*, et chez une tortue : *Chrysemis picta*.

Nous avons trouvé des *Hæmogregarina* chez plusieurs tortues de l'Inde et de l'Indo-Chine : *Cryptopus granosus* (*Emyda granosa*), *Emys tectum*, *Emys spinosa*, *Emys crassicolis* (?), *Emys sigris* (?) [1] chez des *varans* : *Varanus dracœna* (Inde), *Varanus arenarius* (Sénégal), (les préparations de sang parasité de cette dernière espèce nous ont été montrées par le Dr Marchoux) ; chez des Ophidiens : *Naja tripudians* var. *atra* (Inde), *Naja* species (?) (espèce indienne à losanges dorés avec des parties sombres), *Coluber* species? (Inde), et *Bothrops viridis* (Cochinchine).

Comme on le voit par cette énumération, l'ordre des Crocodiliens était jusqu'à cette année le seul où l'on n'eût pas signalé des *Hæmogregarina ;* nous avons établi, par des recherches chez *Gavialis Gangeticus* et *Crocodilus porosus* (?) que ces deux espèces ont des parasites de ce genre (P.-L. Simond, 1901, bis). Notre collègue et ami le Dr Marchoux nous a dit avoir constaté également l'existence de *Hæmogregarina* chez *Crocodilus* species (?) du Sénégal.

Il y a donc parmi les Reptiles 30 espèces d'Ophidiens, 7 espèces de Sauriens, 3 espèces de Crocodoliens et 9 espèces de Chéloniens chez lesquels on connaît à ce jour des hématozoaires du genre *Hæmogregarina* [2].

En dépit de la multiplicité des observations, l'histoire naturelle de ce genre est encore très incomplète. On connaît un certain nombre de stades des parasites, mais la difficulté d'établir la filiation de ces stades, l'absence de plusieurs chaînons et en particulier des formes qui transmettent la maladie d'un individu à un autre, empêchent de reconstituer le cycle évolutif de chaque espèce, de délimiter les espèces et même de définir le genre avec précision.

La plupart des auteurs qui ont observé des Hémogrégarines chez les reptiles les ont rapportées sans discussion à l'espèce

1. Nous ne sommes pas certain des noms de ces deux dernières espèces observées en Cochinchine.

2. Pendant que ce mémoire était en cours d'impression, nous avons eu connaissance d'un travail de M. Carl Börner intitulé « Untersuchungen über Hamosporidien », paru dans le *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* (vol. 69), à la date du 19 mars. L'auteur décrit trois Hémogrégarines trouvées par lui chez *Crocodilus frontatus*, *Alligator mississipiensis Platemys* species (?), *Clemmys elegans*. *Coluber Esculapii*, ce qui porte à 31 le nombre des espèces d'Ophidiens, à 5 le nombre des espèces de Crocodiliens et à 11 le nombre des espèces de Chéloniens, chez lesquels on connaît des parasites endoglobulaires du genre *Hæmogregarina*.

Hæmogregarina Stepanovi, décrite par Danilewsky chez *Emys orbicularis;* d'autres comme Labbé (94) ont multiplié les genres et les espèces, en se fondant sur des caractères qui semblent insuffisants ou sans valeur à la plupart des sporozoologistes. Enfin l'on confond souvent, comme Adolph Lutz et Langmann, dans une même description, les formes rencontrées dans une série d'espèces différentes de Reptiles. De toutes ces incertitudes et de toutes ces défectuosités, résultait un véritable chaos dans les notions acquises concernant l'histoire naturelle des hématozoaires endoglobulaires soit des Reptiles, soit des autres animaux. Laveran (99) y a introduit l'ordre qui faisait défaut en rétablissant la classification sur des bases rationnelles autant que le permet l'état actuel de nos connaissances. Il a pu définir d'une manière satisfaisante les genres et diverses espèces.

Il existe un certain nombre d'Hémogrégarines des Reptiles qu'il est, jusqu'à présent, impossible de classer faute d'une connaissance assez complète de leurs stades chez un même hôte ou chez divers hôtes de même espèce. En examinant un grand nombre de reptiles parasités par *Hæmogregarina,* nous avons constaté que si l'on retrouve presque constamment des formes susceptibles d'être confondues avec certains stades de *Hæmogregarina Stepanovi*, le type du genre, elles s'accompagnent fréquemment de stades particuliers qui ne se rencontrent chez aucune autre espèce d'hôte, et que l'ensemble des formes trouvées chez des hôtes de même espèce, dans une même région, pouvait constituer un groupe possédant une physionomie spéciale. Ces observations nous font penser que la première condition pour arriver à classer ces parasites sera d'étudier en détail pour chaque espèce d'hôte les formes parfois très variées qui s'y rencontrent. Dans quelques cas déjà, la présence de stades caractéristiques observés concurremment avec des formes banales dans le sang d'une même espèce hôte, a permis de considérer les *Hæmogregarina* qui les possédaient comme des espèces particulières[1].

Il semblait jusqu'ici que le genre *Hæmogregarina* dût fournir à lui seul tous les parasites endoglobulaires des Reptiles. Cette règle cependant souffre des exceptions, une pour le moins. Nous

1. Tel est le cas, en outre de celles classées par Laveran en 1899, pour *Hæmogregarina platydactyli* Billet et pour les trois *Hæmogregarina* décrites ici.

avons, en effet, signalé la présence chez une tortue de l'Inde *Trionyx indicus* (P.-L. Simond, 1901), d'un hématozoaire endoglobulaire pigmenté, proche parent de ceux des oiseaux et qui doit être rangé avec eux dans le genre *Hæmamœba*.

Les hématozoaires endoglobulaires des Reptiles rencontrés au cours de nos recherches dans l'Inde et l'Indo-Chine, qui nous ont paru devoir être considérés comme des espèces nouvelles, comprennent trois *Hæmogregarina* et un *Hæmamœba*, ce sont : *Hæmogregarina Mesnili*, parasite de *Emys tectum*, *Hæmogregarina Laverani*, parasite de *Cryptopus granosus*, *Hæmogregarina Hankini*, parasite de *Gavialis gangeticus*, et *Hæmamœba Metchnikovi*, parasite de *Trionyx indicus*. Nous les décrirons successivement.

II

HÆMOGREGARINA MESNILI, PARASITE DE EMYS TECTUM.

Les tortues qui ont servi à cette étude, au nombre de 17, ont été capturées dans la Jumna en décembre 1897; nous avons fait nos examens sur la plupart d'entre elles pendant les deux mois qui ont suivi leur capture, une seule a été conservée pour l'étude jusqu'en 1899, dans notre laboratoire de Saïgon.

Les nombreux stades que nous avons étudiés, principalement dans le sang périphérique, peuvent être réunis en plusieurs groupes suivant leur volume et leur forme, pour la facilité de la description. Nous distinguerons : 1° les stades jeunes amiboïdes ; 2° les stades vermiculaires en forme de cornue ; 3° les stades vermiculaires réniformes ; 4° les stades vermiculaires proprement dits; 5° les stades de multiplication.

1° *Stades jeunes amiboïdes.* — Les formes endoglobulaires les plus petites (fig. 1, 2, 3, 4) ont un aspect amiboïde, des contours un peu irréguliers et, souvent, une extrémité qui paraît en voie de se prolonger en forme de queue. Dépourvues de noyau visible à l'état frais, elles montrent, après coloration au bleu, un nombre variable de grains cyanophiles [1] inégaux,

1. On appelle généralement en cytologie chromatine, matière chromophile ou matière chromatique, la substance karyoplasmique qui se colore par le bleu de méthylène ou d'autres colorants. Laveran (1900) a réussi à déceler, par une méthode nouvelle qui les colore avec intensité, des noyaux spéciaux à certains hématozoaires, noyaux absolument réfractaires au bleu de méthylène et aux autres méthodes de coloration en usage jusque-là. Pour éviter toute confusion entre la

dont un presque toujours plus volumineux que les autres. A

Fig. 1. — Hæmogregarina Mesnili. (Gross. 1.000 diam.)

1, 2, 3. — Stades jeunes amiboïdes (bleu méthylène).
4. — Stade plus âgé qui a pris un contour régulier (bleu méth.).
5. — Corps amiboïde (probablement jeune parasite) appliqué sur un globule (bleu méth.).
6. — Stades en cornue très peu postérieurs ou stade amiboïde (bleu méth.).
7, 8. — Stades en cornue à leur maximum de développement (bleu méth.).
9. — Stades en cornue binucléés (bleu méth.).
10. — Stade réniforme à noyau transversal (bleu méth.).
11. — Stade réniforme contenant des granulations incolorables (bleu méth.).
12. — Stade réniforme à grand noyau longitudinal (bleu méth.).
13. — Stade vermiculaire à deux branches égales (bleu méth.).
14. — Stade vermiculaire à trois branches dont deux plus courtes (état frais).
15. — Même stade que le 14 après coloration au bleu méth.
16. — Stade vermiculaire très long à trois branches entrelacées en 8 (état frais).
17. — Stade différent du st. 14 par la soudure des branches (due à la fixation?) (bleu méth.).
18. — Mérozoïtes libres et fragment d'un corps à mérozoïtes (état frais).

substance constitutive de ces noyaux de découverte récente et celle colorable par le bleu de méthylène, nous désignerons la dernière, au cours de ce mémoire, sous le nom de substance cyanophile, terme qui précise bien sa propriété distinctive.

plusieurs reprises, nous avons observé des corps amiboïdes, longs de 3 à 6 μ, pourvus de grains semblables, soit libres, soit accolés à des globules, soit en voie de pénétrer dans leur substance (fig. 5), mais il ne nous a pas été possible de déterminer s'il s'agissait réellement du stade jeune du parasite ou de formes particulières de leucocytes.

2° *Stades vermiculaires en forme de cornue.* — Le jeune parasite, postérieurement à son entrée dans le globule, perd son aspect amiboïde pour prendre une forme de cornue, c'est-à-dire de vermicule, dont le corps est renflé en forme de panse dans la plus grande partie de sa longueur, et se termine en une queue effilée repliée plus ou moins complètement sur la panse (fig. 6). Les grains cyanophiles, tantôt persistent en plus ou moins grand nombre, tantôt disparaissent; mais il s'est constitué un noyau cyanophile compact qui peut devenir très volumineux (fig. 7). Quand les corps sont arrivés à leur maximum de développement, la queue s'atrophie et semble disparaître tout à fait; leur forme est alors celle d'un boudin ou d'un rein allongé (fig. 8).

Le noyau des stades caudés que nous venons de décrire est unique; tantôt son grand diamètre est transversal, tantôt les diamètres transversal et longitudinal sont sensiblement égaux. On trouve des corps en cornue chez lesquels, de très bonne heure, on constate l'existence de deux noyaux de substance cyanophile, tantôt rapprochés, tantôt éloignés l'un de l'autre, presque toujours avec leur grand diamètre dirigé longitudinalement.

Les corps où l'on rencontre ce double noyau appartiennent à une série de stades en cornue, de petite dimension, à contour ovale fort régulier, pourvus d'une queue le plus souvent courte, rarement de même longueur que la portion sur laquelle elle est repliée, qui ont beaucoup d'analogie avec certains stades rencontrés chez *Trionyx indicus* (fig. 9).

3° *Stades vermiculaires réniformes.* — Ces stades, toujours volumineux, ont l'apparence d'un boudin ou mieux d'un rein allongé; leurs extrémités sont arrondies et sensiblement semblables. Une série d'entre eux sont caractérisés par un gros noyau transversal compact. A l'état frais, le corps paraît parfois granuleux; il est presque toujours dépourvu de grains cyanophiles après coloration (fig. 10). Assez fréquemment, on trouve ces stades remplis de granulations réfringentes incolorables par le

bleu (fig. 11) ; nous considérons les corps de cette série comme faisant suite aux stades caudés, mononucléés (fig 8).

Dans une autre série, le noyau au lieu d'être transversal est allongé longitudinalement. En général, les corps de cette série sont grands, leur karyosome cyanophile est appliqué le long d'un des bords, soit du côté convexe, soit du côté concave ; à ce karyosome est adhérente une zone réfringente, claire, qui peut-être fait partie du noyau. Le reste du plasma se colore très légèrement en bleu à la périphérie (fig. 12).

Ces stades nous ont semblé évoluer vers la division en mérozoïtes et provenir soit des vermicules caudés à noyau double, soit de vermicules allongés dont les branches se seraient fusionnées. D'autre part on rencontre, quoique rarement, des formes semblables plus petites dans lesquelles le bleu ne colore ni karyosome, ni grains cyanophiles ; ces formes pourraient constituer le premier stade des corps réniformes à noyau longitudinal.

4° *Stades vermiculaires proprement dits.* — Ces stades constituent une série nettement tranchée. Le parasite est ici un vermicule replié une ou plusieurs fois, dont le corps, d'un diamètre sensiblement égal sur la plus grande partie de sa longueur, s'effile légèrement à une extrémité. Le noyau cyanophile, tantôt simple, tantôt double, a son grand diamètre presque toujours longitudinal. Les plus petits vermicules de cette série ont deux branches sensiblement égales (fig. 13) ; ceux qui viennent ensuite sont repliés deux fois, mais leur 3e branche est courte ou même les deux parties repliées sur la partie médiane forment deux branches courtes comme certains stades de *Hæmogregarina platydactyli* (Billet) (fig. 14, 15).

Enfin les plus grandes formes ont leurs trois branches de longueur égale, entrelacées en huit de chiffre, de telle sorte qu'au premier abord il est difficile de se rendre compte si l'on a affaire à un seul ou à deux parasites accolés (fig. 16). La longueur totale de ces vermicules paraît dépasser 30 μ. On observe bien ces formes surtout dans le sang frais. Aucune autre tortue que *Emys tectum*, où ils sont d'ailleurs assez rares, ne nous a jamais présenté de stades semblables ; aussi les considérons-nous comme caractéristiques de l'espèce d'Hémogrégarine parasite de *Emys tectum* que nous avons dédiée à notre ami M. Mesnil.

Dans les préparations colorées, on voit quelquefois des corps pourvus d'un noyau cyanophile allongé, qui ont l'aspect de vermicules repliés deux ou trois fois dont les branches se seraient soudées. Nous pensons qu'il s'agit probablement en effet de vermicules de ce genre dont les lignes de séparation des branches ont été effacées par la fixation ; à leur place se dessine un sillon au fond duquel on voit le noyau (fig. 17).

5° *Stades de multiplication.* — Nous n'avons jamais rencontré dans le sang périphérique des formes de reproduction, mais seulement des mérozoïtes libres, mobiles, possédant parfois deux granulations réfringentes, une à chaque extrémité. Ces corps mesuraient 5 à 8 μ; ils étaient pourvus de mouvements analogues à ceux des mérozoïtes de diverses coccidies : contraction et allongement très limités, flexion et redressement, progression très lente (fig. 18). A l'autopsie de quelques individus, nous avons trouvé dans le sang retiré des os, par compression, et surtout du foie et du poumon, des corps, inclus dans les globules ou libres, qui évoluaient manifestement vers la segmentation.

Nous avons rencontré aussi des agglomérations de 3 à 7 mérozoïtes semblables à ceux du sang périphérique, accolés étroitement, qui provenaient sans conteste de la désagrégation, au cours de la préparation, de stades à mérozoïtes mûrs (fig. 18). Toutefois nous n'avons pu observer ces stades à l'état complet et sans altérations.

Sans doute ce stade à mérozoïtes n'est pas la seule forme de multiplication endogène de notre parasite. Il ressort en effet de la comparaison des groupes de formes décrits, que les stades vermiculaires proprement dits dériveraient des mérozoïtes figurés ici, tandis que d'autres, tels que les stades à forme de cornue, semblent succéder à un stade primitif amiboïde, dont nous n'avons pu retrouver l'origine.

Langmann (99) a signalé des corps à flagelles chez *Hæmogregarina* des boas, toutefois sa description et ses figures n'entraînent pas la conviction. Nous avons vu une seule fois, dans le sang de *Emys tectum*, un corps analogue à ceux figurés par cet auteur. Il consistait en une sphère hyaline d'où partait un flagelle unique, mobile, long de 20 μ environ, qui manifesta pendant plus d'une demi-heure des mouvements assez actifs, mon-

trant par intermittences de petits renflements sur sa longueur.

En raison de l'analogie apparente de la substance de ce corps avec le plasma des globules, nous l'avons considéré comme une dégénérescence globulaire, telle qu'en montre parfois le sang des tortues et, plus communément, le sang de certains hiboux.

A part quelques individus très jeunes, tous les exemplaires de *Emys tectum* que nous avons eus entre les mains étaient parasités. Les altérations des globules sanguins parasités ne sont guère appréciables que lorsqu'ils renferment des corps volumineux. Elles consistent en une déformation du contour et un déplacement du noyau, sans hypertrophie ; en même temps, le plasma disparaît consommé par le parasite et, dans certains cas, le globule est presque réduit à l'état d'une pellicule.

III

HÆMOGREGARINA LAVERANI, PARASITE DE CRYPTOPUS GRANOSUS.

Cet hématozoaire a été découvert dans le sang de *Cryptopus granosus* (*Emyda granosa*) chez trois individus provenant des environs d'Agra, les seuls que nous ayons eus à notre disposition. La plupart des stades observés se différencient très nettement de ceux des autres Hémogrégarines connues. Pour les décrire, nous les grouperons en séries selon qu'ils sont jeunes ou adultes, qu'ils affectent la forme amiboïde, vermiculaire, réniforme ou caudée, en distinguant trois catégories principales : stades jeunes, stades réniformes, stades caudés.

1° *Stades jeunes.* — Les plus petits stades rencontrés ont la forme soit d'amibes, soit de vermicules.

Les formes amiboïdes très jeunes (fig. 1) mesurent à peine 3 μ de diamètre, elles ont un contour irrégulier et variable. A l'état frais, elles apparaissent réfringentes sans aucune différenciation dans leur plasma : fixées, elles ne montrent pas de noyau, mais, quand elles atteignent 4 à 5 μ de diamètre, elles renferment quelquefois un petit noyau et plus souvent plusieurs grains cyanophiles (fig. 12). A partir de ce moment, leur contour devient plus régulier de manière qu'elles représentent un corpuscule ovalaire ; leur centre, très réfringent, se transforme

en un noyau, incolorable par le bleu, à la périphérie duquel se disposent en couronne les petits grains cyanophiles (fig. 3). Ces petits grains nous paraissent correspondre à des granulations réfringentes visibles à l'état frais. Un peu plus tard, à la place

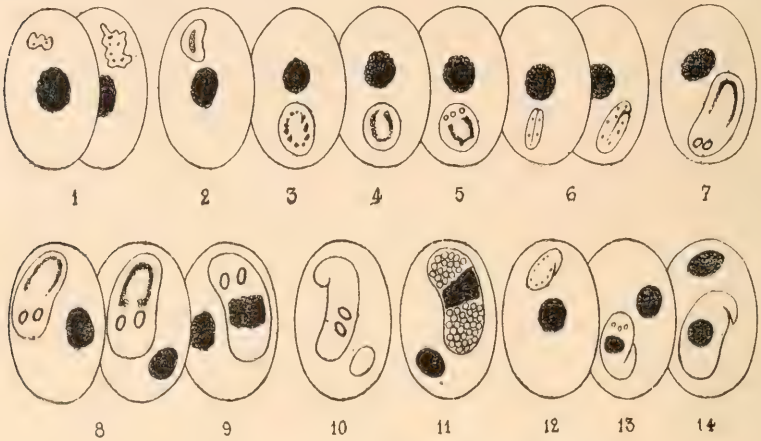


Fig. 2. — Hæmogregarina Laverani (Gross. 1,000 diam.)

1. — Stades jeunes amiboïdes (bleu méth.).
2. — Stade jeune non amiboïde, pourvu d'un noyau (bleu méth.).
3. — Stade jeune dont les grains cyanophiles sont disposés en couronne (bleu méth.).
4. — Stade postérieur au 3 avec liséré cyanophile en fer à cheval (bleu méth.).
5. — Stade semblable au 4 avec quelques granulations incolorables (bleu méth.).
6. — Stades vermiculaires jeunes (bleu méth.).
7. — Stade à deux corpuscules réfringents qui succèdent au 5 (bleu méth.).
8. — Mêmes stades que 7, plus âgés (bleu méth.).
9. — Stade à deux corpuscules réfringents, pourvu d'un noyau cyanophile compact (bleu méth.).
10. — Forme à deux corpuscules réfringents dont une extrémité s'est repliée (état frais).
11. — Stade réniforme à noyau compact contenant des granulations incolorables (bleu méth.).
12. — Stade en cornue jeune (bleu méth.).
13-14. — Stades en cornue à leur maximum d'accroissement.

des grains, on voit un petit liséré de substance cyanophile en fer à cheval, entourant d'une manière incomplète le noyau réfringent incolorable (fig. 4). Presque en même temps apparaissent, à l'extrémité du parasite qui regarde l'ouverture du fer à cheval, deux ou trois vacuoles ou granulations petites, incolorables, qui, après l'action du bleu, demeurent très claires et

réfringentes (fig. 5), et diffèrent par conséquent des granulations des stades amiboïdes plus jeunes.

Fréquemment, au lieu d'être amiboïdes, les stades jeunes ont la forme de petits vermicules, généralement repliés, qui, à l'état frais, ne manifestent aucune granulation et, après l'action du bleu, se montrent pourvus de petits grains cyanophiles dispersés dans leur plasma en nombre d'autant moindre que le parasite est plus jeune (fig. 6). Les branches du vermicule sont assez souvent accolées de telle sorte qu'il est difficile de distinguer cette forme d'une forme amiboïde très jeune.

2° *Stades réniformes.* — Une première série, et la plus importante, des stades réniformes est caractérisée par la présence constante, dans le corps du parasite, de deux corpuscules ovoïdes, volumineux, réfringents, incolorables, dont on ne retrouve l'équivalent chez aucune autre Hémogrégarine connue. Ces stades dérivent, comme il est facile de le voir, des jeunes formes pourvues d'une aire nucléaire incolorable que limite un liséré de substance cyanophile en fer à cheval (fig. 5). Ainsi que nous l'avons dit, ces dernières formes présentent à un moment donné, à une extrémité, plusieurs granulations réfringentes ; dans la suite, on ne voit plus que deux grains qui occupent la même place (fig. 7). A partir de ce moment, il se produit un raccourcissement progressif du liséré cyanophile en fer à cheval, raccourcissement qui entraîne les deux corpuscules dans l'intérieur du corps du parasite comme s'ils étaient liés aux branches de ce liséré (fig. 8).

A la période ultime de ce déplacement, les corpuscules ont atteint environ trois fois leur volume primitif et affectent une forme ovoïde. Le liséré cyanophile, en se rétractant, a, en général, rapproché les extrémités libres de ses branches, de façon à circonscrire presque complètement une aire incolorable du parasite qui paraît en constituer le noyau (fig. 8). Ce noyau est généralement volumineux, parfois la substance cyanophile est raréfiée à sa périphérie, d'autrefois il se laisse colorer d'une façon diffuse dans toute son épaisseur.

D'autres fois enfin il est fortement cyanophile, condensé en une masse transversale compacte, discoïde, à contours nets (fig. 9). Dans ce cas, le corps du parasite ne présente, en dehors du noyau, aucune trace de substance cyanophile. A ces

stades, les corpuscules peuvent être situés diversement et plus ou moins séparés dans le plasma du parasite.

Les stades que nous venons de décrire ne semblent pas susceptibles de former à aucun moment une queue ; cependant nous avons trouvé exceptionnellement, dans la moelle des os, des individus qui avaient une extrémité repliée. Cette extrémité n'était pas effilée et régulière comme dans les stades caudés que nous décrirons tout à l'heure, elle apparaissait simplement repliée sur une faible longueur (fig. 10).

Nous avons constaté que les deux grains, dont la présence constante dans une série de stades est caractéristique de *Hæmogregarina Laverani*, sont des corpuscules véritables et non des vacuoles : en effet, si l'on fait macérer le parasite vivant dans une goutte d'eau, il gonfle jusqu'à ce que sa membrane d'enveloppe éclate, sa substance se disperse dans le liquide sous forme de minuscules granulations agitées de mouvements browniens, et il ne reste, sous le champ du microscope, que ces deux corpuscules ovoïdes qui persistent sans altération dans le sang ainsi dilué.

Beaucoup plus rarement que les corps réniformes à corpuscules réfringents, on rencontre des stades qui en diffèrent surtout parce qu'ils ne contiennent pas les deux corpuscules spéciaux mais, en échange, sont bourrés de granules réfringents incolorables trois ou quatre fois plus petits que ceux-ci (fig. 11). Ces grains sont sphériques, très serrés, et nous ont donné l'impression de petites spores, supposition que rien n'est venu confirmer. Au contraire, la présence dans les stades ainsi granuleux, d'un gros noyau cyanophile, et l'absence de nucléole colorable dans chaque grain semblent bien indiquer que ces formes n'ont rien à voir avec une sporulation. Il ne paraît pas que ce stade réniforme puisse dériver des corps à deux corpuscules réfringents, mais plutôt qu'il provienne des corps caudés que nous allons décrire.

3° *Stades caudés.* — Les formes pourvues d'une queue ressemblent assez à celles rencontrées dans le sang de *Trionyx indicus*, concurremment avec les formes hæmamœbiennes. Elles représentent un vermicule dont une extrémité est renflée en forme de panse de cornue et dont l'autre extrémité, courte et effilée, se replie sur la première. Leur volume n'atteint pas celui des stades

réniformes; elles dépassent rarement la moitié de la longueur du globule sanguin. Il est difficile de reconnaître si elles proviennent des jeunes stades vermiculaires ou des amiboïdes; les plus petites que nous ayons observées ressemblaient à une jeune forme amiboïde avec, en plus, une petite queue repliée (fig. 12); elles renfermaient également des granules cyanophiles. A une période plus avancée, ces vermicules caudés montrent un noyau cyanophile et parfois deux ou trois petites granulations incolorables (fig. 13). Chez les formes les plus grosses, la queue paraît en voie de disparition (fig. 14); ce caractère, ainsi que la colorabilité et la forme condensée du noyau, laissent croire qu'elles deviennent les stades nucléés, bourrés de granulations non cyanophiles, de la figure 11.

A tous les stades observés dans le sang périphérique du *Cryptopus granosus*, le parasite est endoglobulaire. Nous avons vu quelques rares corps libres assez volumineux dans la moelle des os et le foie d'un individu mort depuis la veille; nous ne savons s'il s'agissait d'altérations ou de formes en voie de multiplication.

Le caractère le plus intéressant de cette espèce, que nous dédions à M. le Dr Laveran, est la présence, dans toute une série de stades, des deux grains réfringents; grâce à eux, on peut suivre l'évolution des formes de cette catégorie sans risque de les confondre avec celles d'une série différente.

Les globules parasités du *Cr. granosus* sont assez souvent déformés. Comme chez *Emys tectum*, leur noyau ne semble pas subir, si ce n'est exceptionnellement, d'altération importante; il demeure central pendant les premières phases du développement du parasite, puis est refoulé par celui-ci au fur et à mesure de son accroissement. Lorsque le parasite est volumineux, le noyau du globule est presque toujours relégué tout à fait à la périphérie.

IV

HÆMOGREGARINA HANKINI, PARASITE DE GAVIALIS GANGETICUS (PL. VII).

L'examen d'un certain nombre de gavials capturés dans un affluent du Gange, la Jumna, nous a permis de reconnaître

dans le sang de ces crocodiles un parasite du genre *Hæmogregarina*, le premier hématozoaire signalé dans l'ordre des crocodiliens[1]. Sur six gavials étudiés, cinq étaient adultes et contenaient tous *Hæmogregarina Hankini;* le sixième très jeune, long de soixante-dix centimètres, était exempt d'hématozoaires.

Toutes les formes de *Hæmogregarina Hankini* qu'il nous a été possible d'observer étaient intraglobulaires. Les liens qui les rattachent les unes aux autres sont trop difficiles à saisir pour qu'on puisse distinguer avec certitude la succession des stades de leur évolution endogène. Nous nous contenterons donc, pour la description, de catégoriser les formes en tenant compte seulement de leur configuration et sans nous préoccuper de leur filiation qui sera discutée ensuite.

A ce point de vue de la configuration, les stades intraglobulaires peuvent être divisés en deux groupes : les corps vermiculaires et les corps ovalaires.

PREMIER GROUPE. — CORPS VERMICULAIRES.

Ce groupe se subdivise en deux séries suivant que le noyau est condensé, c'est-à-dire formé d'une masse chromatique compacte qui se colore au bleu de méthylène d'une manière homogène et intense, ou qu'il est fragmenté, c'est-à-dire formé d'un certain nombre de karyosomes ou grains cyanophiles plus ou moins agglomérés ou dispersés dans le plasma.

Dans les deux catégories, le noyau peut être simple ou double : il existe donc un seul ou deux noyaux compacts dans une série, un seul ou deux groupes de grains cyanophiles dans l'autre.

1° *Vermicules à noyau fragmenté.* — Les formes les plus petites, qui sans doute sont aussi les plus jeunes, représentent un vermicule replié à deux branches égales, au milieu de chacune desquelles on remarque quelques grains cyanophiles groupés, trois à six ; on ne distingue aucun de ces grains ni aux

1. Carl Börner a décrit récemment (*l. c.*), sous le nom de *Hæmogregarina crocodilinorum,* des formes qu'il a rencontrées chez *Crocodilus frontatus* et *Alligator mississipiensis.* Ces formes, à en juger par la description et les figures de l'auteur, se rapprochent beaucoup de certains stades de *Hæmogregarina Hankini.* Au cas où il s'agirait de la même espèce, la priorité du nom appartient à *Hæmogregarina Hankini.* En effet nos recherches sur ce parasite ont été publiées le 22 février 1901 (*C. R. de la Soc. de Biologie*, séance du 16 février 1901); les observations de Carl Börner ont été publiées postérieurement aux nôtres, le 19 mars 1901.

extrémités, ni au point de jonction des branches (PL. VII, fig. 1).

Des formes un peu plus grosses ont l'aspect d'un vermicule plus ou moins sinueux, non replié. Par un examen attentif, on reconnaît généralement qu'elles possèdent une ligne médiane ou sillon longitudinal, peut-être la trace d'une séparation antérieure en deux branches comme dans la figure 1, peut-être simplement l'indice d'un accolement très étroit des deux branches, sans qu'il y ait soudure. Les grains cyanophiles sont disposés en deux rangées parallèles, une de chaque côté de cette ligne, et forment un groupe qui occupe environ la moitié de la longueur du vermicule en partant de son extrémité obtuse (fig. 2 *a*, *b*, *c*). Cette forme et la précédente sont rares.

Les grandes formes représentent un long vermicule replié en deux branches égales qui s'écartent vers le milieu pour se rapprocher par leurs extrémités libres, figurant ainsi un O ou un U. Les grains cyanophiles, généralement disposés sur deux rangées parallèles, occupent la moitié ou la totalité de la longueur d'une des branches. Nous n'avons jamais observé d'individu présentant des grains cyanophiles dans les deux branches. A ce stade, les vermicules atteignent une longueur égale aux deux tiers de la circonférence du globule hôte (fig. 3 *a*, *b*). On rencontre des vermicules de même taille et de même forme chez lesquels les grains chromatiques sont agglomérés en un noyau de faibles dimensions.

Les deux branches du parasite sont en ce cas étroitement accolées (fig. 4 *a*, *b*); quelquefois l'une d'elles s'est allongée plus que l'autre et s'est repliée à son tour (fig. 3). Ces stades à grains cyanophiles agglomérés ont leur plasma entièrement colorable par le bleu, ce qui se rencontre rarement chez d'autres formes ; toutefois, la colorabilité du plasma est bien plus faible que celle des grains nucléaires (fig. 4 *a*, *b* et fig. 5).

2° *Vermicules à noyau compact.* — On ne trouve pas, dans cette catégorie, des formes correspondant par leurs dimensions aux petites formes à noyau fragmenté ; tous les vermicules à noyau compact ont la taille des grandes formes de la série précédente. Ils sont en général repliés de manière à former deux branches d'égale longueur tantôt accolées, tantôt rapprochées seulement par leurs extrémités libres (fig. 6 *a*, *b*, *c*, *d*, *e*).

Certains parasites sont repliés deux fois (7 *a*, *b*, *c*); la forme

la plus commune est celle en O avec un noyau unique allongé, fortement colorable, contenu entièrement dans une des branches (fig. 6 *a*, *c*). Nous avons rencontré exceptionnellement des stades à noyau court ou à noyau divisé en deux parties par un étranglement (fig. 8 *a*, *b*) ou qui possèdent deux noyaux, dont l'un très condensé à contour net et l'autre bien délimité (fig. 7 *a*, *b*), ou enfin qui possèdent deux noyaux semblables, allongés, à contours mal définis, situés d'une façon symétrique dans chacune des branches (fig. 20). Parfois le parasite est colorable en entier par le bleu, mais son noyau, beaucoup plus chromophile que le cytoplasme, apparaît toujours nettement (fig. 8 *a*).

A l'état frais les vermicules, lorsqu'ils sont mis en liberté par lyse du globule hôte hors du vaisseau, tantôt demeurent immobiles, tantôt manifestent des mouvements plus ou moins vifs.

La progression s'effectue toujours l'extrémité la plus obtuse en avant. Les contractions de la substance du parasite sont peu apparentes, il ne forme pas d'étranglements, mais, parfois, il allonge en un rostre l'extrémité céphalique, surtout quand elle heurte un globule contre lequel le vermicule fait effort ; ce rostre apparaît et disparaît à la façon d'une proéminence amiboïde. Au bout d'un temps variant de quelques minutes à plusieurs heures, les mouvements s'arrêtent et le parasite meurt. Il est souvent difficile de reconnaître si le parasite mobile possède un noyau compact ou fragmenté parce que le noyau n'apparaît pas toujours nettement à l'état vivant (fig. 9 *a*, *b*, *c*, *d*).

DEUXIÈME GROUPE. — CORPS OVALAIRES

1° *Formes petites.* — Les plus jeunes stades de ce groupe ont l'aspect d'un petit ovoïde plus ou moins régulier renfermant d'ordinaire un seul noyau central, compact, allongé (fig. 10), et quelquefois deux zones cyanophiles excentriques, à contours plus ou moins diffus (fig. 11). Une seule fois, nous avons observé un parasite qui paraissait formé de deux jeunes corps ovalaires comme celui de la figure 10, soudés l'un à l'autre par une extrémité et présentant chacun un noyau central, condensé, très développé (fig. 12) ; nous pensons qu'il s'agit d'un accolement et que la séparation a été effacée par la fixation.

2° *Formes moyennes.* — Les stades plus volumineux, qui cons-

tituent les formes moyennes, cessent d'avoir un noyau bien délimité et fortement colorable ; ils renferment des petites masses chromatiques plus ou moins disséminées dans le cytoplasme et disposées en deux groupes (fig. 13 *a*, *b*, *c*). Fréquemment, ils présentent une ligne médiane qui semble être une trace de soudure de deux corps (fig. 13, *b*, *c*, et fig. 14); cette ligne peut être visible à l'état frais (fig. 14).

3° *Grandes formes.* — Les grandes formes ovalaires sont de trois sortes, les unes à noyau compact, d'autres à noyau à contours diffus, d'autres à noyau fragmenté dont les grains sont dispersés.

Les corps à noyau compact sont rares, ils portent en général un sillon médian qui paraît provenir de la soudure antérieure des deux branches d'un vermicule unique (fig. 15, *a*, *b*, *c*); parfois tout leur cytoplasme est colorable par le bleu (fig. 15 *c*). On pourrait rapporter à ce groupe les grands vermicules colorables par le bleu dont les branches sont étroitement accolées et qui ont un noyau en partie fragmenté (fig. 4 *b* et fig. 5).

Les corps à noyau au contour diffus ont la substance cyanophile inégalement répartie à la périphérie où elles forment souvent des traînées nuageuses (fig. 16 *a*, *b*.); ils montrent quelquefois un sillon médian incomplet et difficilement visible (fig. 16 *b*). Pour toutes les formes où l'on constate soit à l'état frais, soit après coloration, un sillon de ce genre, il est difficile de dire si l'on a affaire à une soudure véritable des branches d'une forme antérieurement vermiculaire, ou s'il s'agit seulement d'un accolement de ces branches si intime qu'on ne peut distinguer leur plan de séparation. Les formes à noyau fragmenté ne possèdent pas de ligne ou sillon médians. La majeure partie ou la totalité de leurs grains cyanophiles sont communément disposés en couronne à la périphérie (fig. 17 *a*, *b*, *c*). Certaines formes possèdent à la fois des grains bien nets et des traînées diffuses de substance cyanophile (fig. 17 *a*, et fig. 18). Un individu qui doit être rangé dans cette série nous a présenté une apparence de début de sporulation endogène à la façon de certains stades des Hématozoaires des oiseaux et de l'homme (PL. VII, fig. 19); nous doutons toutefois qu'il s'agisse réellement d'un stade de multiplication.

Dans certains stades ovalaires, nous avons constaté la présence de quelques grains réfringents, petits, sphériques, qui ont l'apparence de vacuoles.

RELATIONS ENTRE LES DIVERS STADES

Bien qu'il soit particulièrement difficile d'établir la filiation des stades intraglobulaires décrits ci-dessus, nous croyons qu'on peut, pour quelques-uns d'entre eux tout au moins, reconnaître l'ordre dans lequel ils évoluent.

C'est ainsi que le stade au noyau fragmenté de la fig. 2 semble bien succéder au stade de la fig. 1. Nous inclinons à croire que ce stade de la fig. 2 peut s'allonger et se replier pour aboutir au stade de la fig. 3, mais les intermédiaires nous manquent.

L'analogie de forme des grands vermicules à noyau compact (fig. 6), avec les vermicules à noyau fragmenté de la fig. 3, nous fait admettre qu'ils succèdent à ces derniers par réunion des grains cyanophiles. Le dernier terme observé de cette évolution serait représenté par les corps des fig. 4, 5, 15, qui ont les apparences de vermicules dont les branches sont accolées ou en train de se souder.

Ces stades constitueraient une première série des formes de l'évolution endogène.

Toutes les autres formes peuvent être rangées dans une deuxième série qui aurait pour point de départ les corps ovalaires des figures 10, 11 et 12. Les corps porteurs d'un sillon médian (PL. VII, fig. 13 *a*, *b*, *c*) résultent probablement de l'accolement accidentel de deux jeunes formes comme la figure 12 en donne un exemple.

Nous avons fait connaître, pour la première fois chez les Coccidies, un mode de division nucléaire qui se rapproche de la division amitotique et suivant lequel la masse chromatique du noyau se fragmente en un nombre variable de nucléoles qui se portent à la périphérie de la cellule pour donner naissance à autant de noyaux de nouveaux parasites[1]. Siedlecki a décrit

1. P. L. SIMOND. Évolution des Sporoz. du genre *Coccidium*. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1897.)

avec beaucoup de détails ce processus à propos de *Klossia octopiana*[1]. Les corps ovalaires de la figure 17 nous présentent une fragmentation de la chromatine en granules distribués à la périphérie du parasite qui semble procéder de ce mode de division, et qui rappelle de très près le stade que nous avons décrit chez les *Coccidium* comme précédant la formation des mérozoïtes ou des gamètes. La figure 18 représenterait le stade immédiatement postérieur à celui où la division du cytoplasme est en train de s'effectuer. Par conséquent, nous croyons devoir attribuer à ces corps des figures 17 et 18 le rôle de stades préparatoires à la multiplication endogène. Nous ne saurions d'ailleurs préjuger en rien leur signification au point de vue des formes nouvelles qui doivent en résulter. Aboutissent-ils à des gamètes mâles ou à des gamètes femelles ou à des mérozoïtes[2] ? Aucune de nos observations ne nous autorise à émettre une opinion à cet égard. Dans les cellules du poumon, nous avons observé des stades à mérozoïtes incomplètement mûrs. Ces corps étaient sphériques, mesuraient environ 20 μ et comprenaient 30 à 40 éléments fusiformes sans reliquat de segmentation.

Comme pour les hématozoaires des autres Reptiles, l'état sous lequel *Hæmogregarina Hankini* existe hors du corps du gavial nous est inconnu. L'infection par les piqûres de moustiques qui ne semble pas devoir présenter d'impossibilité chez des reptiles dont certaines régions, cou, plis articulaires, sont revêtues d'une peau peu résistante comme chez les tortues, par exemple, est plus difficile à admettre pour les crocodiles. Si tel est pour ces animaux le mode de pénétration des hématozoaires, il est à supposer que cette pénétration ne peut se faire qu'au niveau de la muqueuse buccale. Les jeunes crocodiles qui doivent avoir l'épiderme moins impénétrable que les adultes à l'aiguillon de certains moustiques, ne nous ont jamais présenté d'hématozoaires; l'infection semble les atteindre seulement quand ils ont plusieurs années d'existence. L'hypothèse de l'infection par des

1. Michel Siedlecki : Coccidie de la Seiche. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

2. Nous avons introduit ce terme de *mérozoïte* dans nos publications sur les Coccidies et le microbe de Laveran pour désigner les formes asexuées et les formes femelles qui proviennent de la division directe des stades endogènes. Depuis lors, Siedlecki a appelé très judicieusement *gamètes femelles* nos mérozoïtes femelles, par opposition aux gamètes mâles. Nous estimons, avec Schaudinn, que le terme de mérozoïte doit être conservé pour désigner les formes asexuées de la multiplication endogène.

Acariens, tels que les tiques, lesquels seraient un hôte intermédiaire, hypothèse qui mériterait d'être vérifiée pour les Reptiles terrestres, ne paraît pas admissible, *a priori*, pour les Reptiles amphibies. Ceux-ci, à notre connaissance, sont généralement exempts de tels parasites.

V

HÆMAOEBA METCHNIKOVI, PARASITE DE TRIONYX INDICUS[1] (PLANCHE VIII).

Le *Trionyx indicus* ou *Chitra indica* est une grande tortue d'eau douce, très commune dans beaucoup de fleuves de l'Inde et en particulier dans le Gange et ses affluents; elle se nourrit de poissons et d'autres animaux aquatiques. C'est à elle qu'est dévolu le rôle de purger les eaux du Gange des débris de cadavres indous que les habitants des régions pauvres en combustible jettent au fleuve après une combustion incomplète. Probablement en raison de cette utilité spéciale, le *Trionyx indicus* est extrêmement vénéré des Indous. Chez tous les individus adultes de cette espèce, capturés dans la Jumna au nombre de plus de vingt, nous avons observé l'hématozoaire à stades pigmentés que nous avons appelé *Hæmamœba Metchnikovi*[2].

Les formes les plus caractéristiques de ce parasite sont celles pourvues de pigment et amiboïdes à la façon des stades de tous les autres *Hæmamœba* connus. A côté de celles-ci, on rencontre des stades non pigmentés qui se rapportent à n'en pas douter au type *Hæmogregarina*. Il est extrêmement délicat d'émettre une opinion touchant l'unité ou la pluralité des espèces auxquelles se rapportent les formes si différentes qui cohabitent dans le sang de *Trionyx indicus* d'une manière constante. Cette question sera

1. Par suite d'une erreur, le compte rendu de la communication que nous avons faite à la Société de biologie le 9 février 1901 concernant cet hématozoaire porte *Trionyx gangeticus* au lieu de *Trionyx indicus* qui est, d'après nos recherches dans l'ouvrage de Gunther (Reptiles de l'Inde), le nom véritable de l'espèce de tortue parasitée par *Hæmamœba Metchnikovi* (*C. R. de la Société de biologie*, 9 février 1901.)

2. Notre ami le Dr Billet (1901) a rappelé l'attention sur un hématozoaire endoglobulaire de *Trygonix stellatus* du Tonkin, qu'il avait décrit en 1898 (*Bulletin scient.*, t. 28, p. 279) D'après les figures qu'il donne, cet hématozoaire appartient certainement au genre *Hæmogregarina* et non au genre *Hæmamœba*. Billet reconnaît très justement que son parasite est différent de *Hæmogregarina Stepanovi*; il nous paraît différer aussi des autres espèces, parasites des Reptiles, classées jusqu'ici. Nous proposons pour cette espèce, suffisamment caractérisée par les croquis de Billet, le nom de *Hæmogregarina Billet*.

examinée plus loin. Nous décrirons successivement, pour plus de facilité, comme nous l'avons fait pour les parasites de *Emys tectum*, *Cryptopus granosus* et *Gavialis gangeticus*, les séries de formes observées, comme si elles se rapportaient toutes à une espèce unique d'hématozoaire.

Ces formes peuvent être divisées en deux groupes : les formes hémogrégariniennes et les formes hémamœbiennes.

PREMIER GROUPE : FORMES HÉMOGRÉGARINIENNES

Ces formes sont toujours dépourvues de pigment et toujours munies d'un noyau cyanophile. On doit les distinguer en deux séries selon que leurs stades avancés sont des vermicules caudés, c'est-à-dire constitués par une masse principale terminée par une queue qui se replie sur le corps, ou bien qu'ils ont l'aspect d'un vermicule proprement dit.

1° *Stades caudés.* — A la période où les formes de cette série présentent les plus faibles dimensions et sont par conséquent très jeunes, le parasite constitue un petit ovoïde plus ou moins allongé, pourvu d'un noyau (fig. 1 et fig. 2) rarement visible sans coloration. Par exception on rencontre des stades qui semblent se rattacher à la même période du même cycle et qui possèdent deux noyaux tantôt simples, tantôt accompagnés chacun d'un granule cyanophile (fig. 3 *a*, *b*, *c*). Ceux-ci pourraient résulter de l'accolement ou de la soudure des deux branches d'une forme vermiculaire; c'est là une simple hypothèse en rapport avec leur volume plus considérable et une trace de séparation longitudinale parfois visible (fig. 3 *b*). A un état plus avancé l'Hématozoaire s'est renflé à l'une des extrémités, tandis que l'autre s'est transformée en une queue courte, effilée et toujours repliée. A cet état, le parasite a l'apparence d'une petite cornue dont le tube serait intimement appliqué sur la panse (fig. 4 *a*, *b*, *c*). Le développement de la queue ne nous a pas paru se faire par un allongement de l'extrémité de l'ovoïde, laquelle se reploierait au fur et à mesure de son accroissement, mais par un processus de séparation incomplète, comme par une encoche, d'une portion latérale du corps du jeune parasite; cette portion de substance affecterait dès le début la forme de queue repliée et continuerait de s'accroître ainsi.

L'Hématozoaire à ce stade possède toujours un noyau qui est allongé tantôt dans la panse, tantôt dans la queue, tantôt à leur point de réunion (fig. 4 *a*, *b*, *c*). Par exception, on trouve deux noyaux situés tous les deux dans la panse ou bien l'un dans la panse et l'autre dans la queue (fig. 5 *a*, *b*). Nous croyons que ces individus à noyau double proviennent du stade de la figure 3 et qu'à une période plus avancée les deux noyaux se fusionnent.

L'évolution postérieure a pour effet l'augmentation de volume de l'Hématozoaire. Les formes les plus volumineuses rencontrées occupaient au plus un tiers du globule sanguin. A ce degré il existe toujours un seul noyau cyanophile logé dans la panse (fig. 6 *a*, *b*, *c*).

2° *Stades vermiculaires.* — Les premiers stades de cette série ont l'apparence d'un petit vermicule arqué ou replié contenant quelques grains cyanophiles (fig. 7). A un stade postérieur, le vermicule s'est allongé, il est replié en deux branches de longueur sensiblement égale dont l'une a l'extrémité un peu plus obtuse (fig. 8 *a*). Quand il est arrivé à son maximum de développement, le parasite occupe moins de la moitié du globule sanguin (fig. 8 *b*). A tous les stades, on peut colorer au bleu le noyau, situé au voisinage du point de réunion des deux branches du vermicule.

Les formes de cette série sont les plus rares dans le sang des *Trionyx* parasités, elles se rapprochent beaucoup de stades banaux des Hématozoaires des autres espèces de tortues. Leur rareté nous empêche de penser qu'elles résultent de la transformation des stades caudés, beaucoup plus abondants.

Dans les deux séries que nous venons de décrire, le parasite offre à l'état frais une structure plus ou moins granuleuse et son noyau, grâce à sa réfringence, peut être distingué sans coloration. Après l'action du bleu de méthylène, le corps de l'Hématozoaire reste incolore tandis que le noyau et les grains cyanophiles qui, parfois, l'accompagnent sont très fortement colorés. Nous n'avons jamais rencontré ces formes à l'état libre dans le sang si ce n'est par suite de la dissolution du globule hôte qui se produit fréquemment quelques minutes après la sortie du vaisseau, peut-être par l'effet du contact de l'air. Ni après cette mise en liberté accidentelle, ni à l'intérieur du globule, nous n'avons constaté la mobilité des stades de ce groupe, stades qui

se rapprochent beaucoup de ceux des diverses espèces du genre *Hæmogregarina*.

DEUXIÈME GROUPE : FORMES PIGMENTÉES

Tout au début de leur évolution, les formes destinées à acquérir du pigment sont peu ou pas distinctes les unes des autres. Considérées au cours de leur accroissement, elles se rangent en deux séries à caractères bien distincts; dans l'une, le plasma demeure entièrement incolore après l'action du bleu de méthylène; dans l'autre, il est très légèrement et uniformément colorable par le même procédé.

1° *Stades non colorables à gros grains de pigment.* — Au stade de cette série le plus jeune en apparence, l'Hématozoaire affecte la forme irrégulière d'un amibe de 1 à 3 μ de diamètre. Tantôt il est arrondi, tantôt allongé, souvent étranglé et figurant un 8 ou une petite gourde. Très vite, il acquiert un ou deux petits grains de pigment (fig. 9 *a*, *b*, *c*, *d*). Un peu plus tard il a perdu la forme étranglée en 8 pour prendre communément celle d'un rein large et court dont le bord concave regarde le noyau du globule. Il a acquis un nombre peu considérable de grains de pigment, de couleur brune plus ou moins foncée, dont la plupart sont volumineux.

Ces grains de pigment sont ou disséminés dans sa substance (Pl. VIII, fig. 10, 11, 12), ou relégués à la périphérie. Quelquefois ils paraissent extérieurs au parasite (fig. 11); c'est une apparence très rare, qui résulte probablement d'une contraction du parasite postérieure à sa sortie du vaisseau. Aux stades plus avancés, le volume augmente, mais la forme demeure la même. Les individus les plus volumineux ne dépassent guère la moitié du globule sanguin, avec un diamètre de 6 à 10 μ. A aucun moment, les grains de pigment ne présentent un groupement régulier, presque toujours ils sont dispersés à la périphérie du corps sans aucun ordre.

Ces grains sont assez volumineux et toujours en petit nombre, rarement plus de six. Les stades que nous venons de décrire sont doués de mouvements amiboïdes très lents (fig. 12 *a*, *b*, *c*, *d*). Le corpuscule à l'état frais est transparent, sans granulations ni noyau visible et si ce n'étaient les grains de pigment qu'il

renferme, on le prendrait pour une vacuole du globule. Desséché et fixé il n'est nullement colorable par le bleu ; par l'action prolongée de l'éosine, on arrive quelquefois à colorer légèrement sa partie centrale. Sur des préparations déjà vieilles, nous avons pu démontrer que cette partie centrale est un noyau volumineux qui se colore par la méthode de Laveran (fig. 10 *b*).

2° *Stades colorables à petits grains de pigment.* — Les parasites de cette série ne se différencient guère au stade le plus jeune de ceux de la précédente (fig. 9 *a*, *b*, *c*, *d*), mais à partir du moment où ils ont acquis un certain nombre de grains de pigment, la dimension et l'arrangement de ces grains permettent de les reconnaître même à l'etat frais. De bonne heure en effet ces grains se disposent en groupes, ils ont un volume plus petit et sont plus nombreux que dans les stades de même âge de la série précédente (fig. 13 *a*).

A un état plus avancé, la forme des parasites est généralement allongée et incurvée; ses deux extrémités sont arrondies, mais l'une est en général plus renflée. Les grains de pigment sont réunis en groupes dont le plus important affecte presque toujours la forme d'un anneau. Les grains qui ne font pas partie de l'anneau forment un seul ou deux groupes, relégués à une ou aux deux extrémités du parasite. Nous avons observé plusieurs fois un mouvement très vif d'une partie des grains de pigment; ils formaient alors trois groupes, un à chaque extrémité et un intermédiaire. C'est dans ce dernier qu'on voyait des grains mobiles (fig. 16).

Un certain nombre de parasites montrent deux à quatre petites sphères réfringentes qui sont peut-être des vacuoles (fig. 14 *a* et fig. 16). Les mouvements amiboïdes existent à tous les stades pareils à ceux constatés dans l'autre série pigmentée: ils ne se produisent plus quand le parasite est mis en liberté dans le plasma. par dissolution à l'air du globule de l'hôte. Les corps les plus volumineux, comme dans le cycle précédent, dépassent assez rarement la moitié de la longueur d'un globule sanguin, soit 9 à 10 μ (fig. 14).

Outre leur forme et l'arrangement de leurs grains de pigment qui les font reconnaître à première vue, à l'état frais ou fixés, les stades de cette série offrent un caractère distinctif important, la colorabilité : ils prennent le bleu de méthylène assez faible-

ment à la façon des parasites du paludisme humain. Cette coloration par le bleu est généralement uniforme, parfois plus claire au centre. Quand existent les sphères ou vacuoles réfringentes dont nous avons parlé, celles-ci ne se colorent pas (fig. 14 *a*). Par la méthode de Laveran, nous avons fait apparaître dans ces formes un noyau qui est en général situé dans la partie la plus volumineuse du corps et entouré par les grains de pigment en anneau (fig. 14, *c*).

L'analogie des deux formes pigmentées de *Hæmamœba Metchnikovi* avec les stades pigmentés des *Hæmamœba* des oiseaux est complète. Les différences que ces deux formes présentent entre elles, volume des grains de pigment, colorabilité du plasma, volume du noyau, sont de même ordre que celles que les travaux d'Opie (98), Mac Callum (98) et Laveran (1900) ont révélées entre les formes mâles et femelles de *Hæmamœba Danilewsky* et *Hæmamœba relicta*. Par suite nous devons considérer les stades à gros grains de pigment et à noyau volumineux de notre parasite, comme des gamètes mâles, et ceux à petits grains, à protoplasma légèrement colorable par le bleu de méthylène, comme des gamètes femelles.

Le globule sanguin de *Trionyx indicus*, parasité soit par les formes pigmentées, soit par des formes vermiculaires, ne paraît pas souffrir beaucoup. Il est rarement déformé et le noyau conserve presque toujours sa situation, sa colorabilité et son volume normaux.

La phagocytose s'exerce avec plus ou moins d'intensité pour les diverses formes du parasite ; c'est dans la rate et dans le poumon qu'on l'observe surtout. Les stades dont nous avons constaté l'englobement par des phagocytes appartenaient en majeure partie aux formes pigmentées, quelques-uns aux formes caudées, aucun aux formes vermiculaires (fig. 17, 18, 19, 20).

VI

CONSIDÉRATIONS SUR LA SPÉCIFICITÉ DES FORMES PARASITES DES GLOBULES SANGUINS DES REPTILES

Nous avons au début de ce mémoire signalé les lacunes de nos connaissances concernant les hématozoaires endoglobulaires des reptiles. En ce qui concerne les hémogrégarines, on

connaît un certain nombre de stades inclus dans les globules et quelques formes de multiplication endogène, en particulier celles de *Hæmogregarina Stepanori* bien étudiées par Laveran; mais, même pour ce dernier parasite, le mieux connu de tous, nous ne savons pas la signification de toutes les formes, en particulier de stades effilés, très mobiles, et de stades pourvus à une de leurs extrémités d'un renflement volumineux, qui ont été vus par Danilewsky, par Sawchenko et par nous dans le rein de *Emys orbicularis*. D'autre part, les stades de reproduction endogène que Danilewsky, Laveran, Billet, Labbé, Adolphe Lutz et nous-même avons observés dans le sang des organes internes, qui se rencontrent de préférence dans les capillaires du foie, du poumon, des os et de la rate, paraissent constituer des corps à mérozoïtes, destinés à la multiplication du parasite dans les tissus de l'hôte.

S'il existe des conjugaisons, des formes de reproduction sexuée, nous n'avons pas su jusqu'ici les distinguer. Enfin nous ne connaissons pas les formes qui permettent le transport du parasite d'un individu à un autre. A ce point de vue, ni les recherches que nous avons pratiquées sur des sangsues habituelles aux tortues de la Jumna, ni celles sur des uncinaires très communs dans la gueule de divers serpents, n'ont eu jusqu'à présent aucun résultat; personne n'a signalé non plus de faits en faveur d'une transmission soit par les moustiques, soit par des parasites de la peau.

Si l'on ajoute à cela que jusqu'ici les procédés d'inoculation n'ont pas abouti à des succès positifs, on voit que nous manquons des meilleurs éléments pour distinguer et caractériser des genres et des espèces. On est réduit à cet égard à se baser uniquement sur la morphologie des stades connus des parasites.

D'après les descriptions des divers auteurs et en particulier d'après les travaux de Laveran, nous croyons qu'on peut ranger dans le genre *Hæmogregarina* tout hématozoaire endoglobulaire, dépourvu de pigment à tous les stades chez son hôte connu, dont les stades adultes possèdent un noyau de substance cyanophile, et dont certains stades endoglobulaires ont la forme de vermicules repliés ou caudés. Un autre caractère qui appartient provisoirement à ce genre est l'impossibilité de distinguer des formes sexuées.

Pour ce qui est de caractériser les espèces, nous estimons qu'on doit provisoirement considérer comme espèces distinctes seulement les parasites dans l'évolution desquels on trouve, en outre de stades communs à d'autres espèces, des stades constamment et nettement différents de tous ceux connus.

Tel est le principe que nous avons appliqué aux trois *Hæmogregarina* décrites plus haut : *H. Mesnili* est caractérisée par le stade vermiculaire à trois branches entrelacées ; *H. Laverani* par le stade réniforme à deux corpuscules incolorables ; *H. Hankini* par les gros vermicules recourbés dans le globule et rejoignant leurs extrémités de manière à dessiner un anneau ovale régulier.

Nous avons décrit, comme s'ils appartenaient au même parasite, tous les stades rencontrés dans chaque espèce hôte à côté du stade caractéristique. Il y a lieu de se demander si les séries de formes assez différentes du sang de *Emys tectum* ou d'autres Reptiles sont réellement les chaînons d'un cycle évolutif unique, ou si plusieurs hématozoaires vivent côte à côte dans les globules sanguins.

On sait d'une manière positive que le sang peut être parasité simultanément par plusieurs espèces extraglobulaires, trypanosomes, nématodes, etc..., mais la présence, dans le sang d'un même individu, de plusieurs parasites endoglobulaires est loin d'être fréquente. Bien mieux, il est encore très peu de cas où l'on ait démontré qu'une même espèce animale pouvait offrir l'hospitalité de ses globules successivement à plusieurs parasites endoglobulaires. Au contraire, si l'on considère une région limitée du globe, ce fait paraît être général, qu'à une espèce donnée d'hématozoaire endoglobulaire corresponde une espèce d'animal hôte ou un groupe d'espèces voisines. Si nous prenons les oiseaux, par exemple, nous voyons que chez le pigeon, dans les pays où il est sujet à cette maladie, c'est toujours le même hématozoaire et celui-là seul qu'on rencontre. Parmi les reptiles nous trouvons *Emys orbicularis* toujours porteur des mêmes *Hæmogregarina Stepanowi* et il n'a jamais été avancé, par aucun des savants qui ont examiné cette espèce de tortue dans différentes contrées d'Europe, qu'elle renfermât, soit une espèce différente de celle décrite par Danilewsky, soit d'autres espèces, en même temps que cette dernière. Il y a pourtant deux exceptions :

Opie (98) a rencontré trois fois les formes *Hæmamœba Danilewsky* et *Hæmamœba relicta*, réunies chez un même individu. D'autre part, parmi les nombreuses divisions créées par Labbé dans l'ancien genre *Drepanidium*, Laveran (99) a retenu comme espèces distinctes deux *Hæmogregarina : H. ranarum* et *H. splendens*, qui peuvent se rencontrer simultanément chez *Rana esculenta*.

A part ces deux exceptions établies par des auteurs compétents, il est de règle générale qu'on trouve dans un hôte une seule espèce endoglobulaire et, dans la même région, ce même parasite chez tous les hôtes de même espèce. Notre présomption que toutes les formes rencontrées chez *Emys tectum* sont des stades d'un seul parasite, qu'il en est de même pour les hématozoaires de *Cryptopus granosus* et *Gavialis gangeticus*, est donc en harmonie avec des faits acquis. L'objection la plus importante qui se soit présentée à nous, c'est que nous n'avons pas trouvé chez tous les *Emys tectum* examinés la totalité des stades décrits; souvent une série entière ou même plusieurs nous ont paru manquer dans le sang périphérique. Mais on sait que tous les stades des hématozoaires, dans la plupart des cas, ne se rencontrent pas simultanément chez l'hôte et le paludisme humain nous en est un bel exemple. Pour *Emys tectum* en particulier, chez un individu conservé très longtemps en laboratoire, nous avons trouvé, seulement au bout de six mois, des stades en longs vermicules à trois branches. Cet *Emys* renfermait donc bien l'espèce *H. Mesnili* alors même que les seuls stades visibles étaient des vermicules très voisins en apparence de ceux de *Hæmogregarina Stepanovi*.

Si l'on compare les stades rencontrés chez des espèces animales éloignées, on voit s'accentuer les différences morphologiques entre leurs hématozoaires respectifs; c'est ce qui ressort clairement de notre description des parasites de *Emys, Cryptopus* et *Gavialis*.

La question d'unité ou de pluralité d'espèces endoglobulaires chez *Trionyx indicus* est encore plus compliquée que dans les cas précédents. Nous sommes ici en présence de stades, pigmentés qui doivent sans hésitation être rapportés au genre *Hæmamœba* et, à côté de ces stades, nous voyons des formes que rien n'autorise à séparer du genre *Hæmogregarina*. Il est donc fort difficile

d'admettre à première vue qu'il s'agit de deux séries de stades d'un même parasite. Il y a cependant quelques arguments à invoquer en faveur de l'unité parasitaire. Chez tous les *Trionyx* porteurs d'*Hæmamœba*, on rencontrait des formes hémogrégariniennes. Entre les unes et les autres formes on constatait une certaine analogie de volume, les plus grosses des deux catégories dépassant rarement la dimension de la moitié d'un globule. Enfin l'existence de stades d'apparence hémogrégarinienne dans le cycle d'*Hæmamœba* n'est pas un fait inconnu : les pseudovermicules décrits chez certains oiseaux par Danilewsky (89) puis par Kruse, L. Pfeiffer et Mac Callum, ont l'apparence de véritables formes de *Hæmogregarina* ; un des points les plus singuliers de l'histoire de ces corps est de les voir, après qu'ils ont succédé à un *Hæmamœba*, dont le noyau était invisible à l'état frais et incolorable par le bleu de méthylène, manifester, aussitôt tranformés en vermicules, un noyau semblable à ceux des stades de *H. Stepanovi*. Mac Callum a montré que ce vermicule provient du corps femelle fécondé, il est donc appelé à devenir une forme de reproduction. Bien que rien n'autorise à le rapprocher des hémogrégarines, il nous semble que cette analogie de forme méritait d'être signalée à propos des stades vermiculaires qui accompagnent constamment les formes typiques de *Hæmamœba Metchnikovi*.

Nous avons exposé les arguments qui plaident pour ou contre l'individualité spécifique des formes décrites ici comme des espèces nouvelles. On ne saurait considérer la question comme résolue, nous le répétons, tant que, soit par la connaissance du cycle complet, soit par l'expérimentation, on n'aura pas démontré que ces stades s'enchaînent les uns aux autres ou n'ont au contraire aucun lien entre eux.

CONCLUSIONS

Il existe des hématozoaires endoglobulaires chez les Crocodiliens aussi bien que chez les autres ordres de Reptiles.

Nous avons constaté l'existence chez une tortue d'eau douce, *Trionyx indicus*, d'un hématozoaire qui doit être rangé dans le genre *Hæmamœba*. Si donc la plupart des Reptiles sont parasités par *Hæmogregarina*, on ne saurait considérer cette règle comme absolue.

Les hématozoaires endoglobulaires considérés chez des Reptiles différents offrent des différences d'autant plus accentuées que les espèces hôtes sont plus éloignées.

Il est possible, malgré l'imperfection de nos connaissances sur le cycle évolutif des hématozoaires des Reptiles, de distinguer des espèces différentes certaines, à la condition de n'admettre comme telles que celles qui possèdent des stades morphologiquement caractéristiques.

En considérant les faits connus chez les Oiseaux, ou chez les Reptiles dont les parasites, comme *Hæmogregarina Stepanovi*, ont été bien étudiés, on peut admettre comme règle générale qu'à une espèce hôte donnée ou à un groupe d'espèces voisines correspond une espèce de parasite endoglobulaire ; que si l'espèce hôte est susceptible d'être infectée par plusieurs parasites, on ne les rencontre pas dans son sang simultanément. Cette règle néanmoins souffre des exceptions et l'on connaît deux cas certains d'infection simultanée par deux parasites.

En dépit de ces exceptions il est vraisemblable que les formes variées trouvées chez *Emys tectum* appartiennent à une espèce unique et qu'il en est de même pour celles décrites chez *Cryptopus granosus* et *Gavialis gangeticus*. Il est plus difficile de penser que les formes hémogrégariennes trouvées chez *Trionyx indicus*, à côté des stades pigmentés de *Hæmamœba*, fassent partie du cycle évolutif de ce dernier parasite.

La reproduction expérimentale de l'infection et, à défaut, la connaissance plus parfaite de l'histoire naturelle des hématozoaires des reptiles pourront seules permettre de résoudre cette question de l'unité ou de la pluralité des espèces parasites des globules chez chacun des Reptiles qui ont fait l'objet de nos recherches.

Nous adressons à nos éminents maîtres, MM. Metchnikof et Laveran, dont les conseils autorisés nous ont été précieux pour tous nos travaux concernant les Sporozoaires, l'expression de notre affectueuse gratitude.

MÉMOIRES CITÉS

95. — Billet, Hématozoaires endoglobulaires des serpents, *C. R. Soc. de Biologie*, 1895, p. 30, et *Bull. scient. France et Belgique*, t. XXVIII, 2e partie, 1898, p. 279.

1900. — Billet, Sur un hématozoaire endoglobulaire du Platydactylus, *C. R. Soc. Biol.*, 9 juin 1900.

1901. — Billet, A propos de l'hématozoaire endoglobulaire pigmenté des *Trionyx*, *Hæmamœba Metchnikovi*, Simond, *C. R. Soc. Biol.*, 9 mars 1901.

86. — Danilewsky, Sur les hématozoaires des lézards, *Archives slaves de Biologie*, 1886.

89. — Danilewsky, *La Parasitologie comparée du sang*, vol. I et II, Charkow, 1889.

98. — Hagenmuller, Sur les Hémosporidies d'un ophidien, *Arch. de zool. exp., notes et revue*, p. li, 1898.

94. — Labbé, Recherches zool. et biolog. sur les par. endogl. du sang des Vertébrés, *Arch. zool. expérimentale*, 1894.

99. — G. Langmann, On Hœmosporidia in American Reptiles and Batracians, *New-York Medical Journal*, 1899.

98. — Laveran, Contribution à l'étude de *Hæmogregarina Stepanovi*, *C. R. Soc. Biologie*, oct. 1898.

98 *bis*. — Laveran, Les Hématozoaires endoglobulaires (Hæmocytozoa), *Cinquantenaire de la Soc. de Biologie*, Paris, 1899.

99. — Laveran, Sur une méthode de coloration des noyaux applicable en particulier à l'étude des hématozoaires endoglobulaires, *C. R. Soc. Biologie*, 9 juin 1900.

1901. — A. Lutz, Ueber die Drepanidium der Schlangen, *Centr. f. bakt.*, Abth. I, 21 mars 1901.

98. — Mac Callum, On the Hœmatozoan infection of birds, *The journal of experim. Med.*, 1898, p. 117.

98. — L. Opie, On Hæmocytozoa of birds, *The journal of experim. Med.*, 1898, p. 79.

91. — L. Pfeiffer, *Die Protozoen als Krankheiterreger*, 2e éd., 1891, p. 81.

1901. — P.-L. Simond, Sur un hématozoaire endoglobulaire pigmenté des tortues, *C. R. Soc. Biologie*, 9 février 1901.

1901 *bis*. — P.-L. Simond, Sur un hématozoaire endoglobulaire (*Hæmogregarina Hankini*), parasite du gavial. *C. R. Soc. Biologie*, 16 février 1901.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE VII

---

1. — Corps vermiculaire très jeune (bleu méthylène).

2 *a*, *b*, *c*. — Corps vermiculaire à un stade qui paraît succéder à celui de la fig. 1 (bleu méth.).

3 *a*, *b*. — Grandes formes vermiculaires à noyau fragmenté (bleu méth.).

4 *a*, *b*. — Grandes formes vermiculaires à noyau fragmenté, à cytoplasme légèrement colorable (bleu méth.).

5. — Grande forme vermiculaire analogue à fig. 4, repliée deux fois (bleu méth.).

6 *a*, *b*, *c*, *d*, *e*. — Grandes formes vermiculaires à noyau cyanophile compact (bleu méth.).

7 *a*, *b*. — Grands vermicules à noyau compact, repliés deux fois (bleu méth.).

7 *c*. — Même stade que fig. 7 *a* et *b*, à l'état frais.

8 *a*. — Grand vermicule à noyau divisé en deux parties, à cytoplasme colorable (bleu méth.).

8 *b*. — Même stade que fig. 8 *a*, avec cytoplasme incolorable (bleu méth.).

9 *a*. — Grand vermicule devenu mobile après lyse du globule hôte dont le noyau seul persiste (état frais).

9 *b*, *c*, *d*. — Même vermicule que fig. 9 *a*, en mouvement dans la préparation (état frais).

10. — Jeune forme ovalaire nucléée (bleu méth).

11. — Jeune forme ovalaire dont la substance cyanophile n'est pas massée (bleu méth.).

12. — Parasite à deux noyaux paraissant résulter de l'accolement de deux corps pareils à celui de la fig. 10 (bleu méth.).

13 *a*, *b*, *c*. — Corps ovalaires jeunes paraissant résulter de soudure ou accolement de deux individus (bleu méth.).

14. — Corps ovalaire semblable à ceux de la fig. 13, à l'état frais.

15 *a*, *b*, *c*. — Grands corps ovalaires, à noyau compact, qui semblent résulter de la soudure des branches de vermicules semblables à ceux des fig. 4, 5, 6 (bleu méth.).

16 *a*, *b*. — Corps ovalaires où la substance cyanophile est diffuse et irrégulièrement répartie à la périphérie en masses nuageuses (bleu méth.).

17 *a*, *b*, *c*. — Corps ovalaires dont la substance cyanophile est condensée en un grand nombre de grains ou nucléoles répartis à la périphérie (bleu méth.).

18. — Individu possédant à la fois des grains cyanophiles et de la substance cyanophile diffuse (bleu méth.).

19. — Corps ovalaire analogue à fig. 18 (bleu méth.).

20. — Vermicule replié à deux branches pourvues chacune d'un noyau allongé (bleu méth.).

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE VIII

1 *a*, *b*. — Formes très jeunes de la série des stades caudés (état frais).

2 *a*, *b*, *c*. — Mêmes formes que fig. 1, colorées (bleu méth.).

3 *a*, *b*, *c*. — Stades jeunes de la série caudée, à noyau double (bleu méth.).

4 *a*, *b*, *c*. — Stades pourvus de queue, jeunes, mononucléées (bleu méth.).

5 *a*, *b*. — Stades caudés binucléés.

6 *a*, *b*. — Stades caudés ayant atteint leur dimension maximum (bleu méth.).

6 *c*. — Stade caudé de la plus grande dimension (état frais).

7. — Forme très jeune de la série des stades vermiculaires (bleu méth.).

8 *a*. — Stade vermiculaire de taille moyenne (état frais).

8 *b*. — Stade vermiculaire de la plus grande dimension (bleu méthyl.).

9 *a*, *b*, *c*, *d*. — Formes jeunes de la série des stades pigmentés (bleu méthyl.).

10 *a*. — Stade à gros grains de pigment à plasma non colorable, de grandeur moyenne (bleu méthyl.).

10 *b*. — Stades à gros grains de pigment à plasma non colorable dont le noyau a été mis en évidence par la méthode de Laveran (coloration de Laveran sur une préparation au bleu, vieille).

11. — Stade à plasma non colorable volumineux, à gros grains de pigment qui semblent extérieurs au parasite après la fixation (bleu méth.).

12 *a*, *b*, *c*, *d*. — Parasite à gros grains de pigment, mobile dans le globule immédiatement après la sortie des vaisseaux, et qui a passé en quelques minutes par les formes *a*, *b*, *c*, *d* (état frais).

13 *a*. — Jeune stade à plasma colorable et à petits grains de pigment (état frais).

13 *b*. — Stade à plasma colorable un peu plus avancé que celui de la fig. 13 *a* (bleu méth.).

14 *a*. — Stade à plasma colorable et petits grains de pigment, de grandes dimensions (bleu méth.).

14 *b*. — Un parasite de la série à petits grains et un à gros grains de pigment réunis dans un globule (bleu méth.).

14 *c*. — Grande forme à petits grains dont le noyau a été mis en évidence par la méthode de Laveran, sur une vieille préparation au bleu de méthylène.

15. — Forme à petits grains de pigment, en mouvement dans le globule (état frais).

16. — Forme à petits grains de pigment dont quelques-uns sont animés de mouvements très vifs (état frais).

17. — Phagocyte de la rate contenant deux parasites pigmentés colorables et un incolorable (bleu méth.).

18. — Phagocyte de la rate contenant un individu de la série pigmentée colorable (bleu méth.).

19. — Phagocyte du poumon contenant un individu de la série des stades caudés (bleu méth.).

20. — Phagocyte du poumon contenant un parasite à gros grains de pigment et à plasma incolorable (bleu méth.).

RECHERCHES

SUR LA

Digestion intracellulaire et les Diastases des Actinies

PAR M. FÉLIX MESNIL.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Nos connaissances sur les diastases digestives des Invertébrés sont encore bien peu précises, et, en particulier, nous savons peu de choses sur celles qui agissent intracellulairement. Or, à ce dernier point de vue, les Actinies ou anémones de mer constituent un matériel de choix. Grâce à leurs dimensions relativement considérables, grâce à la localisation de la région digestive, il est facile d'en extraire des diastases en quantité convenable et à un degré de pureté relatif, ce qui est impossible si l'on s'adresse aux autres Cœlentérés, aux Éponges[1], aux Platyelminthes ou aux Protozoaires, c'est-à-dire aux autres animaux qui possèdent le pouvoir de digestion intracellulaire.

Et il est particulièrement intéressant de comparer ces diastases qui agissent à l'intérieur même de la cellule qui les sécrète, d'une part aux diastases des animaux supérieurs à digestion extracellulaire, d'autre part à ces produits leucocytaires, dénommés *alexines* ou *cytases*, dont le caractère lysinant vis-à-vis d'une foule de cellules apparaît nettement à la suite des travaux de ces dernières années et qui, physiologiquement, manifestent leur action à l'intérieur du leucocyte qui les produit.

Aussi ai-je volontiers accepté la proposition de mon vénéré maître, M. Metchnikoff, d'étudier à nouveau la digestion chez les actinies. Mes recherches ont été effectuées partie au bord de la mer, partie à l'Institut Pasteur ; ni les conseils éclairés ni

1. Les quelques données que l'on possède sur les diastases des Éponges sont bien peu précises. — Toute cette question de la digestion intracellulaire chez les animaux inférieurs est très bien exposée par Hédon dans le chapitre DIGESTION du *Dictionnaire de physiologie* de Ch. RICHET, t. IV, 1900.

l'intérêt bienveillant de M. Metchnikoff ne m'ont fait défaut. Mes collègues de l'Institut Pasteur, plus versés que moi dans l'étude des diastases et des produits de leur action, m'ont donné souvent des avis précieux dont je leur suis très reconnaissant.

***

Au bord de la mer, j'ai opéré surtout sur l'*Anemonia sulcata* Penn. (= *Anthœa cereus* Ell. et Sol.), belle actinie à longs tentacules, particulièrement commune dans l'anse Saint-Martin, près de Cherbourg, où toutes mes études ont été faites. Cette actinie est surtout abondante dans les mares creusées dans les roches granitoïdes de la région : beaucoup de ces mares sont accessibles à toute marée, et comme l'actinie est absolument sédentaire, on peut faire toutes les expériences de nourriture dans son habitat naturel, c'est-à-dire dans les conditions les meilleures.

A Paris, j'ai opéré avec des actinies venant d'Arcachon (envois de la Station zoologique) et comprenant surtout des *Adamsia Rondeletti* D. Ch. (= *Sagartia parasitica*) et quelques *Actinia equina* L. ; il m'a été bien difficile de faire avec elles, dans des cristallisoirs, des expériences *in vivo*. Mais elles m'ont servi à la préparation, en grande quantité, d'extraits diastasiques dont j'ai pu étudier l'action concurremment avec ceux provenant des actinies de l'anse Saint-Martin que je rapportais à la fin de mes séjours au bord de la mer.

***

La digestion chez les Actinies a déjà donné lieu à un grand nombre de travaux. Ce qui frappe les anciens observateurs, c'est que, chez des animaux aussi voraces, capables d'ingurgiter et de digérer de grosses proies, le suc digestif, ou plus exactement le liquide de la cavité du corps (cavité gastro-vasculaire ou cœlentérique), se montrait peu ou pas actif. La solution de cette énigme a été fournie en 1880 par Metchnikoff [1] qui observa que *la digestion s'accomplit à l'intérieur des cellules endodermiques* et en particulier de celles qui tapissent les « filaments mésentériques », sortes de masses à la surface méandriforme, formées de cordons pelotonnés qui bordent les cloisons rayonnantes ou septa de la cavité gastro-vasculaire. Les auteurs plus récents,

1. Metchnikoff, *Zool. Anzeiger*, 1880, p. 260, et 1882, p. 310.

Willem [1], Chapeaux [2], Bjelooussow [3], ont confirmé cette donnée et la discussion ne porte que sur la question de savoir si, en dehors du processus digestif intracellulaire, il n'y a pas un commencement de digestion ou simplement une dissociation des aliments, soit par le liquide de la cavité gastro-vasculaire (Willem, Chapeaux), soit au contact intime des cellules sécrétantes (Krukenberg). Ce dernier auteur [4], dont les travaux sont contemporains de ceux de Metchnikoff, pensait même que tout l'acte digestif est extracellulaire.

La solution de cette question est d'une grande importance théorique au point de vue de l'interprétation des résultats des expériences de digestion à l'aide des extraits diastasiques. Si, comme je vais chercher à le prouver, *tout* l'acte digestif est intracellulaire, les diastases que l'on extrait sont précisément celles qui, physiologiquement, agissent intracellulairement, et les résultats obtenus *in vitro* formeront une contribution intéressante à la question des produits enzymatiques à action intracellulaire ou *endodiastases*; en particulier, leur comparaison avec les alexines reposera sur une base sérieuse.

L'étude *in vitro* de la diastase des actinies (je l'appellerai, pour abréger, *actinodiastase* en donnant à ce mot le même sens générique qu'on donne à celui de *diastase*) a été ébauchée par Léon Frédéricq [5], puis par Krukenberg (*l. c.*) et Chapeaux (*l. c.*). Le résultat le plus net de leurs recherches est que l'actinodiastase renferme une trypsine. Il paraît y avoir une certaine contradiction entre cette notion et celle que l'on doit à Metchnikoff [6] et à Chapeaux, du virage au rouge du tournesol dans les vacuoles digestives. Nous verrons, en précisant les conditions d'action de l'actinodiastase, que la contradiction n'est qu'apparente. A côté de protéases, l'actinodiastase renferme

1. Willem, *Bull. Soc. médecine Gand*, nov. 1892, p. 295 (extrait *in Zool. Anzeiger*, 1893, p. 10).

2. Chapeaux, *Bull. Acad. royale Belgique*, 3e série, t. XXV, 1893, et *Archiv. zool. expérim.* 3e série, I, 1893, p. 139.

3. Bjelooussow, Etudes de physiologie sur les Actinies (*Travail de la Station zoologique Sébastopol*, 1895), [en russe].

4. Krukenberg, Ueber den Verdauungsmodus der Actinien, *Vergleich. physiol. Studien*, etc., *Ite Abth.*, 1880 et *Vergleich. physiol. Vorträge*, II, Grundzüge einer vergleich. physiol. der Verdauung, 1882.

5. Léon Fredericq, *Bull. Acad. royale Belgique*, 2e série, t. XLVI, 1878, p. 226.

6. Metchnikoff, *Ann. Inst. Pasteur*, avril 1893 (voir page 348).

d'autres enzymes que j'ai cherché à mettre en évidence par des expériences précises. J'ai été ainsi amené à rechercher les facteurs qui favorisent et ceux qui entravent ces diverses actions diastasiques; en un mot, à faire une étude aussi complète que possible de l'actinodiastase.

I

Y A-T-IL DIGESTION EXTRACELLULAIRE CHEZ LES ACTINIES ?

Metchnikoff, en découvrant, en 1880, la digestion intracellulaire des Actinies, considéra ce mode de digestion comme d'importance primordiale chez ces organismes. Il ne pense pas (il le dit explicitement dans son mémoire de 1882), contrairement à l'opinion exprimée par Balfour dans son *Traité d'Embryologie*, qu'il y ait à la fois digestion intracellulaire et digestion extracellulaire. Et il rapporte, pour corroborer son opinion, les vieilles et curieuses expériences de Couch et Lewes [1] qui n'ont jamais obtenu de digestion des matières nutritives enfermées dans des tuyaux de plume, des morceaux de papier réactif ou de taffetas gommé, et celles plus récentes de Krukenberg, à la suite desquelles ces savants conclurent à l'absence complète de sucs digestifs dans les cavités gastriques des Actinies [2]. Les Hertwig, dans leur belle monographie des Actinies [3], parlent bien de sécrétion de sucs digestifs, mais ils ne donnent aucune preuve positive à l'appui de leur manière de voir, basée sur de pures considérations anatomo-histologiques.

Plus tard, Willem, qui croit « qu'il existe réellement une sécrétion à propriétés digestives dans la cavité cœlentérique », ne donne aucun argument probant : il regarde simplement comme impossible la digestion d'un animal entier, tel qu'une crevette, dont la carapace reste *intacte*, sous le concours d'un processus extracellulaire. Chapeaux a cherché à serrer la ques-

1. G. H. Lewes, *Sea-side Studies*, Edimbourg et Londres, 1858.
2. Déjà auparavant, Hollard (*Ann. Sc. Nat. Zool.*, tome XV, 1851, p. 288), qui ne mettait pas en doute l'existence d'une digestion dans la cavité gastrique avait noté « les faibles réactions chimiques » des sucs du canal alimentaire.
3. O. et R. Hertwig, *Jenaische Zeitschr.*, XIII, 1879, p. 561.

tion de plus près, et il base son opinion de l'existence d'une digestion dans la cavité gastro-vasculaire sur deux ordres de preuves :

1°) La réaction du liquide qui sort d'une actinie quand, après l'avoir retirée de l'eau de mer et l'avoir égouttée, on la presse, est plus alcaline que celle de l'eau de mer; avec l'alizorine sulfo-conjuguée d'Ehrlich, on a une teinte violette avec le liquide de l'actinie, rose violacée avec l'eau de mer.

J'ai reproduit cette réaction avec des actinies (*Adamsia Rondeletti*, synonyme de *Sagartia parasitica* dont Chapeaux dit s'être servi) d'Arcachon et aussi avec des *Anenomia sulcata* de l'anse Saint-Martin. Le liquide de ces dernières était extrait. aussitôt l'animal retiré de la mer. J'ai opéré avec des *Anemonia*, dont la cavité du corps était vide d'aliments, sur un individu en train de digérer une grosse proie (crabe), sur divers autres qui avaient reçu la veille ou bien des matières inertes (poudre de carmin) ou bien des matières nutritives (fibrine de porc, caillot de mouton, etc.). Avec les liquides de toutes ces actinies, j'ai eu une coloration rouge violacée, exactement comme avec l'eau de mer. L'alcalinité de ces liquides est donc sensiblement celle de l'eau de mer. C'est l'opinion des anciens auteurs (Lewes, Hollard) ;

2° Le liquide extrait des actinies agit sur la fibrine; son action est principalement dissociante. La critique précise de ces expériences de Chapeaux est difficile, car il ne donne aucun détail; il ne dit pas si la fibrine qu'il a employée était cuite ou crue, quelle était la température d'action, etc. Il n'en est pas moins vraisemblable que les phénomènes de dissociation qu'il a observés rentrent soit dans les cas de « digestion chloroformique » de de Marbaix et Denys, soit plutôt dans ceux de « digestion saline » de Dastre. J'ai fait agir, sur de la fibrine *crue* de mouton, ou de porc, ou sur des globules ou des caillots de mouton, à 18-20°, en milieu chloroformé, le liquide retiré d'actinies placées dans les diverses conditions que j'ai indiquées dans l'alinéa précédent. L'action dissociante et un peu dissolvante qui se produit est identique à celle que l'on obtient en se servant d'eau de mer chloroformée. On ne peut donc pas parler d'une action particulière du liquide des actinies.

Si l'on opère avec de la fibrine chauffée à 58° (c'est-à-dire

débarrassée de toutes les diastases qu'elle entraîne du sang), l'action digestive des liquides de la cavité gastro-vasculaire est complètement nulle, même à 36° et au bout d'un temps très long. J'ai constaté que ces liquides n'ont ni action présurante, ni action lipasique; Chapeaux lui-même a reconnu que leur action amylolytique est nulle[1]. Ces liquides, *normalement*, ne précipitent ni par la chaleur ni par le sulfate d'ammoniaque; ils n'ont aucune réaction des albuminoïdes. Comme l'ont fait remarquer Couch et Lewes depuis longtemps, leur composition semble différer peu de celle de l'eau de mer.

Quant aux observations de Chapeaux faites sur le vivant, elles ont pour but, le processus extracellulaire étant admis, de déterminer l'origine de la diastase qui agit extracellulairement. Il la trouve dans les filaments mésentériques et note l'action *directe* de ces filaments. Nous sommes amenés ainsi à l'opinion émise par Krukenberg et combattue dès 1882 par Metchnikoff, qu'il y a action digestive au contact intime des cellules digestives et des matières nutritives. C'est la seule digestion extracellulaire qu'admette Krukenberg qui nie les propriétés digestives du liquide gastro-vasculaire.

Or, mes observations sur la digestion des caillots d'oiseaux (poule, oie) prouvent manifestement que cette manière de voir est encore inexacte. Si l'on ouvre une actinie (*Anemonia*), 5 à 6 heures après l'ingestion d'un caillot, on constate par observation au microscope que les globules, dans la partie restée extracellulaire du caillot, ont, sauf de très rares exceptions, conservé leur forme et leur hémoglobine, même ceux qui sont au contact intime des filaments mésentériques. En revanche, la majeure partie des globules intracellulaires sont devenus sphériques et leur hémoglobine commence à diffuser; quelques-uns montrent des formes de passage entre l'ellipsoïde et la sphère. Cette observation, très facile à vérifier, prouve donc, d'une façon évidente et mieux que les expériences à résultat

1. Ce liquide n'est pas non plus microbicide. Chapeaux a vu des algues vertes y vivre plusieurs jours. En particulier, il n'est pas bactéricide : j'ai constaté que si l'on donne à une actinie une grande quantité de fibrine, la partie non digérée de cette fibrine présente le lendemain un commencement de putréfaction dans la cavité gastro-vasculaire. C'est de la même façon qu'il faut expliquer le commencement de putréfaction que présentent dans cette cavité les proies volumineuses qui ne sont pas rapidement digérées; il est inexact de supposer qu'elles ont été ingérées à l'état de cadavres.

négatif exposées précédemment, qu'il n'y a ni digestion, ni acte préparatoire quelconque, ni dans la cavité cœlentérique ni au contact intime des filaments mésentériques.

Il n'y a pas digestion extracellulaire chez les Actinies. — Nous expliquerons plus loin comment peut se faire la digestion des proies grosses et massives.

II

DIGESTION INTRACELLULAIRE

La digestion intracellulaire constitue donc le seul mode d'assimilation des aliments chez les actinies. D'ailleurs, il faut bien dire que les partisans de la digestion extracellulaire ne méconnaissent pas l'importance du processus intracellulaire. Chapeaux, par exemple, s'exprime ainsi : chez les Coelentérés, « on peut dire que c'est à l'intérieur même de la cellule que se produit l'acte digestif proprement dit; c'est là que se fait la dissolution, la transformation de la partie utile de la nourriture et non dans la cavité gastro-vasculaire ».

Presque toutes les expériences que nous allons rapporter ici ont été faites sur des *Anemonia sulcata*, et dans les conditions de vie naturelles de ces animaux (température extérieure, 15-20°). Quelques-unes ont été réalisées avec d'autres espèces, telles que *Actinia equina*, *Bunodes gemmacea*, etc. Nous pensons donc que nos résultats sont applicables à tout le groupe des Actinies, sauf peut-être avec de très légères variantes.

Nous avons nourri nos Actinies avec les substances les plus diverses. Comme matières nutritives, nous avons employé les fibrines de porc et de mouton, les caillots de mouton, d'oie, de poule, le muscle du pied et les viscères d'escargot et de patelle, les muscles d'écrevisse et de crevette; comme substances inertes, des poudres diverses, comme la poudre de carmin, ou bien de tournesol; mais cette dernière n'est ingérée qu'avec un substratum nutritif. Nous avons aussi injecté dans la cavité gastrique de nos actinies diverses couleurs dissoutes dans l'eau de mer.

Rôle des filaments mésentériques. — Metchnikoff a montré le

premier que presque toute la nourriture carminée est englobée par les cellules endodermiques des filaments mésentériques ; il a nettement constaté que certaines régions de ces filaments, les régions médianes avec nombreuses cellules urticantes et glandulaires n'absorbent aucune nourriture. La même notion du rôle des filaments mésentériques ressort des observations de Krukenberg, en laissant de côté l'interprétation de cet auteur. Les travaux plus récents ont confirmé ces résultats.

On peut mettre nettement en évidence ce rôle capital des filaments mésentériques en faisant ingérer à des actinies du sang, de la fibrine avec du tournesol, ou encore du carmin en poudre ; dans les trois cas, le lendemain de l'expérience, en ouvrant l'actinie, on est frappé de la teinte rosée des filaments mésentériques ; la région rosée présente toujours un liséré grisâtre constitué par la zone à mucus et à cnidocils qui n'a rien absorbé. Au microscope, à l'état frais ou sur des coupes, on distingue très nettement les régions muqueuse et digestive des actinies. Cette dernière ne renferme que de rares cnidocils ; elle a l'apparence d'un vaste plasmode où les frontières cellulaires sont peu ou pas nettes. Chez certaines actinies, par exemple *Anemonia sulcata*, cette région digestive renferme quelques algues symbiotes (zooxanthelles).

Mais ces algues, qui se rencontrent toujours dans les cellules endodermiques, sont surtout nombreuses dans les régions du corps les mieux exposées à la lumière : tentacules et disque péribuccal.

Si la nourriture donnée à l'actinie n'est pas trop volumineuse, l'absorption est localisée aux filaments mésentériques. Mais si elle est en très grande abondance, tout le revêtement endodermique peut participer à son absorption, comme l'a fort bien fait remarquer Willem. Ainsi, quand une *Anemonia* a reçu un gros caillot, le lendemain les filaments mésentériques ont leurs cellules digestives littéralement bourrées de globules, et de plus, on trouve des hématies dans les cellules endodermiques qui tapissent extérieurement l'œsophage, dans celles des tentacules, mais toujours en quantité beaucoup moins grande que dans le système mésentérique.

Digestion du sang. — Il est facile d'observer la digestion d'éléments figurés tels que les globules du sang à l'intérieur des

cellules endodermiques. A première vue, il semble que les hématies englobées soient mélangées intimement au protoplasme de la cellule actinienne. Mais, à un examen plus attentif, on reconnaît la présence de vacuoles autour de ces globules; l'observation est surtout facile quand ils sont par petits amas: il n'est pas rare d'en trouver des tétrades séparées du protoplasme environnant par un léger espace clair. La première transformation du globule est la mise en boule : le phénomène est surtout net si l'on a affaire à un globule d'oiseau; le globule paraît avoir diminué notablement de volume; en réalité, il est transformé en une sphère; mais, à ce moment, il n'a encore perdu aucune partie de son hémoglobine; aussi, paraît-il plus fortement teinté qu'une hématie normale.

A l'intérieur, le noyau n'est pas visible. Mais, dans les préparations colorées, on le retrouve avec sa structure chromatique normale. Tantôt il est au centre de la sphère, tantôt il est excentrique; parfois, il a gardé sa forme elliptique; d'autres fois, il est devenu sphérique. Ce dernier phénomène, que j'ai observé nettement chez des *Actinia equina* nourries de sang 3 jours auparavant, indique que la membrane du noyau finit par être attaquée.

Dès que l'hématie est devenue sphérique, son hémoglobine diffuse peu à peu; déjà 6 à 7 heures après l'ingestion du caillot sanguin, l'hémoglobine s'échappe de l'hématie. Mais le phénomène présente son maximum vers la fin du 1er jour et dans le 2e jour qui suivent l'incorporation du sang. Une partie de l'hémoglobine passe dans la cavité gastro-vasculaire et circule dans toute l'actinie. Le lendemain et quelquefois le surlendemain d'une nourriture sanguine, la plupart des actinies ont leurs tentacules vivement teintés de rouge; l'ablation d'un de ces appendices et l'examen microscopique prouvent qu'il renferme à son intérieur un liquide coloré en rouge, sans hématies en suspension.

Le noyau est la partie du globule qui est digérée en dernier lieu; nous l'avons retrouvé intact au bout de 3 jours; au bout de 5 jours, des globules complètement décolorés montrent encore, en leur centre, un amas de granulations chromatiques.

Formation d'un pigment vert d'origine sanguine. — La digestion de l'hématie ne paraît donner naissance à aucun produit de déchet spécial dans la cellule endodermique où elle s'accomplit:

on n'a rien, par exemple, de comparable aux transformations que M. Metchnikoff a observées dans les phagocytes des mammifères et même dans les cellules endodermiques des planaires. C'est ailleurs que se déposent des produits que l'on doit vraisemblablement regarder comme étant des excreta de la nutrition sanguine. Si l'on observe en effet une actinie, et de préférence une *Anemonia sulcata*, qui a mangé du caillot, deux ou trois jours après cette nourriture, on constate que ses filaments mésentériques, jusque-là jaune rougeâtre, commencent à passer au vert. La partie digérante du filament renferme encore de nombreuses hématies; mais les cellules de la région à mucus et à cnidocils commencent à montrer de nombreux grains verts, arrondis, de 1 μ environ de diamètre. Dans la zone de contact entre les deux régions, digestive et muqueuse, on observe de l'hémoglobine dissoute dont la teinte passe peu à peu au vert. Nous pensons donc que le pigment vert est le produit d'une transformation de l'hémoglobine. *Nous l'avons toujours observé après une nourriture sanguine* (sang de mammifère ou d'oiseau) et jamais après nos autres nourritures.

Quand la digestion des hématies est terminée, le pigment vert persiste et il paraît se conserver très longtemps: il doit être peu à peu rejeté au dehors avec le mucus. Fréquemment, nous avons observé des actinies, ayant mangé plusieurs fois du sang, en train de rejeter un paquet de mucus fortement teinté en vert par le pigment en question.

Lorsqu'on nourrit une actinie plusieurs fois avec du caillot sanguin, le pigment vert s'accumule de plus en plus: et, lorsque les cellules à mucus en sont bourrées, il envahit les cellules digérantes elles-mêmes. L'œsophage (bordure ectodermique) est teinté de vert: il y a aussi du pigment dans les cellules endodermiques des tentacules.

Grâce à ce pigment, on reconnaît sans hésitation une actinie qui a mangé du sang, n'en eût-elle pris qu'une seule fois.

Quelle est la nature de ce pigment? Il est rejeté en nature avec le mucus: il s'agit sans doute d'un pigment d'excrétion. Et, étant données sa couleur et son origine sanguine, on songe de suite à un pigment biliaire, biliverdine ou biliprasine, bien que leur présence n'ait pas encore été reconnue chez les Invertébrés (Dastre). Nous avons cherché à extraire ce pigment. Il est

très peu soluble dans l'eau, le chloroforme et l'éther. Il est soluble dans l'alcool fort. L'alcool à 90°, contenant des filaments mésentériques pigmentés, se colore en vert rougeâtre. Mais tout le pigment n'est pas enlevé ; l'alcool acidulé enlève la partie restante et se colore en vert franc. Tous ces caractères, auxquels nous pouvons ajouter la solubilité dans l'acide acétique glacial, rappellent bien la biliverdine. La solution alcoolique change peu à peu de couleur : le ton vert disparaît en grande partie et on a une teinte brun rougeâtre. La bile de bœuf, en solution alcoolique ou acétique, se comporte de même.

Avec d'autres matières nutritives, telles que la fibrine de mouton, les muscles de gastéropodes, nous n'avons pas observé la formation d'excreta particuliers.

Absorption des grosses proies. — Les actinies ne paraissent pas opérer un grand choix dans leur nourriture. Étant donnée la vie absolument sédentaire de la plupart d'entre elles, elles doivent se contenter de ce qui passe à leur portée. Elles ont ingéré volontiers toutes les matières nutritives que nous leur avons offertes, dans les mares où elles vivent naturellement. Pourtant, nous avons noté que des actinies, très abondamment nourries et à plusieurs reprises avec du caillot de poule, refusaient parfois toute nouvelle nourriture; le caillot mis au contact d'un tentacule, non seulement ne déterminait pas un mouvement convergent d'une partie des autres, mais même le tentacule touché se retirait.

Normalement, les *Anemonia* de l'anse Saint-Martin renferment dans leur cavité gastrique des crabes, des gastéropodes variés, rarement de petits poissons habitant les mêmes mares (*Blennius pholis*) [1]. On peut se demander comment, par le seul processus de digestion intracellulaire, une actinie peut venir à bout de telles proies ; et c'est certainement cette difficulté qui a empêché certains savants (Willem en fait nettement l'aveu) de croire à une digestion intracellulaire exclusive. La difficulté n'est pourtant qu'apparente. La cavité gastrique des actinies (c'est toujours là que l'on trouve les proies à un état de digestion plus ou moins avancé) est divisée, dans sa partie profonde, par de nombreux septa qui portent, à leur extrémité centrale libre, les filaments

1. Parfois aussi, surtout à la suite de coups de vent, nous y avons trouvé des débris d'algues brunes, qu'elles paraissent pourtant incapables de digérer. Ce fait indique un manque de discernement dans le choix de la nourriture.

mésentériques. Ces organes, que nous savons être le siège principal des phénomènes de digestion intracellulaire, sont doués d'une plasticité tout à fait remarquable. On s'en rend compte en en détachant des fragments et en les abandonnant en suspension dans l'eau de mer d'un cristallisoir. Au début, on a une masse assez compacte à surface festonnée; puis, bientôt, les parties qui touchent le fond du vase ou qui affleurent à la surface de l'eau s'étalent suivant un plan horizontal et présentent des déformations très compliquées. On obtient le même résultat au contact d'un corps solide quelconque, un galet par exemple, placé dans l'eau de mer. Ces fragments de filaments mésentériques se comportent donc comme des leucocytes ou des plasmodes de myxomycètes [1]; ils peuvent mouler admirablement les corps solides ou autres qui ont une tension superficielle différente de celle de l'eau de mer.

On conçoit donc bien qu'au contact d'une proie volumineuse et compacte comme un crustacé ou un mollusque, ils entourent la carapace, puis pénètrent par les points de moindre résistance, s'insinuent dans tous les organes, en font une dissection d'une finesse extrême, les englobent en détail, les digèrent; puis, quand l'opération est terminée, les envahisseurs, gorgés de nourriture, abandonnent la carapace vide et souvent *intacte* de leur victime qui est alors rejetée au dehors. On se rend bien compte que telle est la réalité en examinant un caillot sanguin quelques heures après qu'il a été englobé; une partie plus ou moins considérable de ce caillot, parfois la totalité, est pénétrée tout à fait intimement par les filaments mésentériques; et, à l'examen microscopique, on se rend compte que certaines parties du caillot, reconnaissables aux globules, sont intracellulaires [2].

Quand il s'agit d'une proie massive et peu malléable, il est probable que la digestion a lieu au centre de la cavité cœlentérique et que les cellules endodermiques des régions éloignées (tentacules, œsophage, etc.) n'y prennent pas part. Elles peuvent jouer au contraire un certain rôle quand il s'agit d'une proie volumineuse et facilement malléable, tel qu'un caillot sanguin; les filaments mésentériques ne peuvent suffire à la besogne et,

1. Metchnikoff a déjà fait une remarque semblable en se basant sur des observations sur un siphonophore particulièrement transparent *Praya diphyes*.

2. Bjelooussow a noté également cette pénétration intime par les filaments mésentériques des proies ingérées naturellement.

grâce aux puissants muscles des septa[1], l'excès de caillot est soumis à un mouvement de brassage qui le distribue dans les cavités secondaires du système cœlentérique; les cellules de ces canaux peuvent alors, comme Willem et moi-même l'avons constaté, contribuer à l'acte digestif. Mais, étant donnée la nourriture habituelle des actinies, c'est évidemment là un cas exceptionnel.

Réaction des vacuoles digestives. — J'ai déjà dit, en parlant de la digestion des hématies, avoir souvent constaté la présence d'une vacuole autour des hématies intracellulaires. Quelle est la réaction dans cette vacuole? La question ne manque pas d'intérêt, car l'on sait que des diastases qui ne présentent que de faibles différences dans la réaction du milieu peuvent être assez éloignées par les produits de leur action. Metchnikoff a montré, en 1893, que le tournesol bleu ingéré par les actinies vire au rouge, et Chapeaux a fait la même constatation.

De mon côté, j'ai confirmé ces observations; mais je me suis attaché à établir le fait avec la plus grande précision pour plusieurs actinies et pour un grand nombre de matières nutritives qui peuvent servir de support au tournesol. Nous verrons, en effet, dans un chapitre suivant, que les extraits diastasiques des actinies, non seulement agissent en milieu faiblement acide, mais encore en milieu alcalin comme la trypsine des mammifères. On pouvait donc, *a priori*, se demander si, avec certaines substances nutritives, on n'a pas des vacuoles à contenu acide; avec d'autres, à contenu alcalin.

J'ai opéré, à Paris, avec une actinie de la famille des *Sagartidæ* (probablement *Cylista* [*Sagartia*] *viduata*) venant d'Arcachon, et, au bord de la mer, avec de nombreuses *Anemonia sulcata*. Le tournesol finement broyé dans l'eau de mer imbibait des matières nutritives variées : muscles d'écrevisse ou de crevette, muscles ou viscères de patelle et d'escargot, fibrine de porc et enfin caillot de mouton. Avec tous ces substratum, sauf avec le dernier, on est frappé, 24 heures après l'ingestion, de la teinte rose vineuse ou mieux lilas tout à fait caractéristique qu'offrent les filaments mésentériques. Certaines actinies qui avaient ingéré de la fibrine

1. Couch et Lewes avaient noté l'action de ces muscles; mais ils leur attribuaient un rôle beaucoup trop important, puisqu'ils pensaient que les Actinies se nourrissaient uniquement du suc des proies absorbées, puis comprimées par l'appareil musculaire, la partie solide étant rejetée sans modification aucune.

de porc avaient tous leurs filaments mésentériques teintés en lilas foncé. Au microscope, on reconnaît que cette teinte est due à un liquide contenu dans la partie absorbante des filaments [1] et, en ajoutant une goutte d'ammoniaque à la préparation, peu à peu on voit les régions rosées virer au bleu, à mesure que, par destruction des tissus, l'alcali pénètre dans les régions à tournesol. Ces expériences, faciles à répéter, prouvent donc que le tournesol est ingéré en même temps que la matière nutritive qui lui sert de substratum; une partie est dissoute dans les vacuoles digestives et elle marque par sa couleur la réaction du milieu. Cette réaction indique un milieu faiblement acide; la couleur n'atteint jamais en effet le rose franc.

Avec le caillot sanguin, l'aspect est différent. Il est évident, qu'étant donnée la présence du sang [2], on ne peut reconnaître l'existence de tournesol rouge. Mais on se convainc facilement qu'il y a eu aussi, dans ce cas, virage du tournesol en ajoutant une goutte d'ammoniaque; on obtient une teinte verte de la zone qui renferme les hématies.

Donc, dans tous les cas observés, même en employant un substratum naturellement alcalin comme le sang, on constate toujours, dans les vacuoles digestives, une réaction faiblement acide.

Il y a, à cet égard, une différence nette entre les Actinies et les Planaires. Chez des *Dendrocœlum lactœum*, en effet, j'ai constaté, après M. Metchnikoff, que les grains de tournesol bleu, englobés par les cellules endodermiques, restent bleus en grande majorité, et cela même si l'observation est faite longtemps après l'ingestion; quelques-uns pourtant virent au rouge franc, d'autres au lilas. Les vacuoles à réaction acide sont donc exceptionnelles.

Lorsqu'on fait ingérer à une actinie une trop grande quantité de nourriture, elle en rejette une partie enrobée de mucus. Le lendemain de mes ingestions de fibrine avec tournesol, j'ai vu des actinies rejeter une grande quantité de mucus rempli de tournesol bleu; le tournesol n'avait subi aucun virage dans la

1. On y observe très peu de grains : la majeure partie sont restés bleus, les autres rouges ou à une teinte entre le bleu et le rose lilas.

2. A ce moment, beaucoup de globules, quoique devenus sphériques, ont encore toute leur hémoglobine. La sécrétion d'acide dans la vacuole est donc bien, contrairement à la supposition de Chapeaux, contemporaine de l'action de la diastase protéolytique et non postérieure à cette action.

cavité gastrique. Parfois pourtant, au milieu de ce mucus, il y avait quelques petits flocons teintés en lilas foncé; mais un examen de ces flocons y révélait la présence d'algues symbiotes et de débris de cellules, preuve évidente que leur tournesol provenait des cellules digestives qui seules renferment les algues[1]. De toutes ces constatations, on peut conclure qu'il n'y a pas normalement sécrétion d'acide en dehors de la cellule digestive.

Absorption des matières colorantes solides et dissoutes. — L'étude du tournesol nous montre que certaines matières inertes, non nutritives, peuvent être englobées par les cellules digestives. J'ai opéré avec une autre matière en poudre. J'ai broyé finement du carmin dans l'eau de mer et je l'ai injecté, au moyen d'une pipette, dans la cavité gastrique d'actinies, en place dans les mares où elles sont fixées. Le lendemain, ces actinies renferment, dans leurs canaux, un liquide légèrement rosé qui, je l'ai dit dans un paragraphe précédent, ne possède aucune propriété digestive. Les filaments mésentériques sont colorés en rose, d'un rose plus franc que celui que l'on obtient avec le tournesol. Cette teinte est due à la présence, dans les cellules digestives, de nombreux grains de carmin. Il n'y en a pas dans les autres régions du corps[2].

Les autres matières colorantes avec lesquelles j'ai opéré ont été employées en solution saturée dans l'eau de mer, filtrée avant son injection dans la cavité gastrique des actinies. J'ai seulement opéré avec *Anemonia sulcata.*

Pour plusieurs de ces matières colorantes, le siège d'élection est encore la partie digestive des filaments mésentériques : c'est le cas pour l'indigo carmin, le vert de méthyle, la vésuvine, le carminate d'ammoniaque. Dans les cellules, on aperçoit des sphères plus ou moins grosses, colorées d'une façon assez intense par la matière employée. La matière colorante a été

1. Il s'agit ici d'expériences faites à la mer, dans les mares où vivent naturellement les actinies. Au laboratoire, à Paris, j'ai constaté que souvent les matières nutritives enrobées de tournesol, que l'on cherche à faire ingérer aux actinies, sont rejetées non digérées, mais entourées de mucus et que le tournesol a viré au lilas. Sans doute, dans ces conditions mauvaises, un certain nombre de cellules digestives sont détruites et leurs sucs agissent extracellulairement sur les produits introduits dans la cavité gastrique.

2. Presque tous mes prédécesseurs ont également fait ingérer du carmin soit seul, soit avec un substratum nutritif et sont arrivés à des constatations identiques aux miennes.

absorbée à l'état de solution et l'on trouve en effet des filaments mésentériques où la teinte est diffuse; elle s'est ensuite condensée dans des vacuoles des cellules digestives et ce sont ces vacuoles, plus ou moins grosses, plus ou moins fortement teintées que l'on observe au microscope. La quantité de couleur absorbée est généralement assez considérable pour donner aux filaments mésentériques une teinte reconnaissable à l'œil nu.

La distribution du bleu de méthylène est tout à fait variable, on peut même dire fantasque. Dans certains filaments mésentériques, il n'y en a que dans la partie digestive et encore en petite quantité. Dans d'autres, il y en a à la fois dans la partie digestive et dans la zone à mucus. Enfin, on trouve le bleu de méthylène inégalement distribué dans l'ectoderme des tentacules, surtout vers les extrémités, qui sont parfois colorées d'une façon assez intense. Dans les cellules digestives, le bleu est réparti dans des vacuoles assez variables de taille; il y en a d'assez grandes. — Au contraire, dans la zone à mucus des filaments mésentériques et dans l'ectoderme des tentacules, les vacuoles sont assez petites et de grosseur assez uniforme. Cette présence du bleu de méthylène dans les tentacules a un retentissement assez curieux sur la physiologie des *Anemonia sulcata*; elle amène souvent la décoloration des tentacules. Cette coloration est en effet due en grande partie à la présence des algues symbiotes. Or le bleu les fait disparaître. La raison en paraît simple : un écran bleu s'interpose entre la lumière et ces algues.

L'éosine est absorbée également par les filaments mésentériques : la partie digestive est teintée en rose très pâle et on trouve, de-ci, de-là, des masses éosinées assez grosses, irrégulières. Ces masses sont surtout nombreuses dans la zone à mucus. On remarque nettement dans le pied des cellules de cette zone, suivant la surface de contact avec la zone digestive, une bande rose où l'éosine est à l'état diffus.

Pour toutes les matières colorantes expérimentées, solides ou dissoutes, il y a donc absorption par les cellules digestives des filaments mésentériques, et pour toutes, sauf peut-être les deux dernières, c'est évidemment le seul mode d'absorption. Ces matières se condensent dans des vacuoles ou restent à l'état diffus dans les cellules. Elles passent ensuite dans les cellules non digestives; la zone rosée que nous avons observée à la limite

des deux régions cellulaires devait sans doute sa coloration à de l'éosine qui passe de la région phagocytaire à la région muqueuse, tout à fait à la façon du pigment sanguin dont nous avons parlé précédemment. L'éosine est ensuite éliminée comme le mucus ; nous avons en effet observé des actinies, injectées d'éosine, qui, 36 heures après, rejetaient du mucus fortement teinté en rose.

Cette zone muqueuse des filaments mésentériques paraît fonctionner à la façon d'un rein.

Les cnidocils ont une affinité spéciale pour l'éosine ; dès que la cellule urticante est tuée, son cnidocil se colore par l'éosine d'une façon très intense. C'est ce que l'on constate en injectant une actinie vivante avec une solution alcoolique d'éosine, ou en plongeant un tentacule coupé dans une semblable solution. — Les filaments urticants rejetés avec le mucus sont teints très fortement.

En résumé, cette étude des matières colorantes complète les notions que nous a fournies l'ingestion des matériaux nutritifs. *Elle nous montre les cellules digestives des Actinies capables d'absorber les produits liquides et solides introduits dans la cavité gastrique.* Ce sont presque exclusivement les filaments mésentériques qui sont le siège de cette digestion.

III

PRÉPARATION DE L'EXTRAIT DIASTASIQUE

J'ai obtenu un extrait d'actinies doué de propriétés diastasiques très actives en opérant simplement de la façon suivante. On ouvre en deux une actinie suivant un plan axial, ou bien on enlève toute la zone supérieure qui comprend les tentacules et le péritosme. On met ainsi à nu les filaments mésentériques ; on les coupe avec des ciseaux fins. Si l'animal n'est pas à une période de maturité sexuelle (c'est le cas pour les *Anemonia sulcata* de la Manche en août et septembre), l'opération est des plus simples ; il suffit de couper tout ce qui fait hernie dans la cavité gastro-vasculaire. Si l'animal est bourré de produits

génitaux (c'est souvent le cas pour les *Adamsia Rondelett* d'Arcachon pendant la plus grande partie de l'hiver), on sépare, avec soin, à l'aide d'une pince fine, les parties génitales des filaments mésentériques.

Les filaments mésentériques, ainsi isolés, sont naturellement fort imbibés d'eau de mer; on les éponge légèrement au papier buvard et on les pèse. Tous mes extraits et toutes mes évaluations du pouvoir diastasique ont été faits en partant de ce poids [1]. A partir de ce stade de l'opération, j'ai opéré de deux façons différentes. Certaines fois, surtout au bord de la mer, les filaments mésentériques étaient coupés très finement avec des ciseaux, puis broyés soigneusement avec du sable; pour faciliter ce broyage, j'ajoutais une petite quantité d'eau de mer; ensuite le volume de l'eau de mer était porté à un taux tel que 1 gramme de filaments soit dilué dans 10 c. c. d'eau de mer [2]. On peut ensuite conserver cet extrait assez longtemps (au moins 6 mois) à la glacière, en empêchant le développement des microorganismes par du chloroforme à saturation. Pour les expériences de digestion, cet extrait est employé soit tel quel, soit le plus souvent dilué dans 3 ou un plus grand nombre de fois son volume d'eau de mer chloroformée.

Au laboratoire, à Paris, j'opérais un peu différemment. Les filaments mésentériques, finement coupés aux ciseaux, sont étalés en couche très mince, sur une feuille de papier, et placés à 35°, à l'étuve, soit à l'air libre, soit dans un exsiccateur à acide sulfurique. Le lendemain, la dessiccation est accomplie et on peut conserver de longs mois, à l'abri de la lumière, la diastase à l'état sec, sur cette feuille de papier. Lorsqu'on veut préparer l'extrait, il suffit de mettre le papier à imbiber dans un volume d'eau de mer tel que 10 c. c. correspondent à 1 gramme de filaments mésentériques pesés au moment où ils sont retirés de l'animal. On sature ensuite de chloroforme.

Un essai de préparation de diastase par précipitation alcoolique m'a donné des résultats médiocres et je n'ai pas fait de nouvelle tentative.

Dans toutes mes expériences, j'ai employé l'eau de mer comme dissolvant de l'actinodiastase. Je me plaçais ainsi dans

1. Ces filaments bien desséchés sont réduits environ au dixième de leur poids.
2. 10 c. c. d'eau de mer renferment donc 100 fois leur poids de filaments *secs*.

les meilleures conditions pour la constance de composition saline de mon milieu diastasique, car les filaments mésentériques, malgré les précautions prises, entraînent avec eux une proportion variable d'eau de mer; de plus, j'avais un milieu salin de composition aussi voisine que possible de celle du milieu naturel intra cellulaire dans lequel agit l'actinodiastase.

Ces mêmes méthodes de préparation d'extrait des filaments mésentériques ont été utilisées pour obtenir des extraits de diverses régions du corps des actinies. Ainsi, avec un lot d'*Adamsia Rondeletti*, venant d'Arcachon, j'ai fait des extraits du tégument externe, des tentacules, de l'œsophage, des aconties, des parties génitales des septa et enfin des filaments mésentériques. Je me contente d'indiquer ici que l'extrait des filaments mésentériques s'est montré doué de propriétés diastasiques extrêmement supérieures à celles des autres liquides. Dans un paragraphe suivant, je donnerai, par des chiffres précis, une idée de la différence d'activité de ces divers liquides. Dans les pages qui vont suivre, sauf indication contraire, il ne sera question que de l'extrait de filaments mésentériques. — Je vais examiner successivement son action sur les diverses matières albuminoïdes, sur la caséine du lait, sur les matières grasses, sur les matières hydrocarbonées, et enfin sur les microbes.

IV

ÉTUDE DES PROTÉASES DE L'ACTINODIASTASE

A. *Conditions de milieu pour l'action de la diastase.* — L'extrait tel que je le prépare a sensiblement la même réaction que l'eau de mer; on a une réaction sensiblement neutre au tournesol, et il faut ajouter des quantités à peu près équimoléculaires soit de soude, soit d'acide chlorhydrique pour l'amener d'une part à la réaction alcaline à la phtaléine du phénol, d'autre part à la réaction acide au méthylorange.

Dans ce milieu qui, comme on le voit, est plus alcalin que celui des vacuoles digestives des actinies, la diastase présente-t-elle son maximum d'action?

Je l'ai recherché en opérant sur des substances albuminoïdes très diverses : fibrine de porc, gélatine, caillot sanguin, muscle d'écrevisse. L'extrait diastasique était divisé en trois lots : un premier lot était conservé tel quel (B) ; un second était, à l'aide d'une solution de soude, amené juste à l'alcalinité à la phtaléine du phénol (A) ; un troisième (C) était, par adjonction d'une solution d'acide chlorhydrique ou d'acide phosphorique, rendu acide pour le méthylorange. Je faisais ensuite des mélanges, en proportions variables, du premier liquide avec l'un ou l'autre des deux autres de façon à obtenir une gamme de sept milieux allant depuis l'alcalinité à la phtaléine du phénol jusqu'à l'acidité au méthylorange ; deux autres milieux étaient préparés avec des doses encore plus grandes d'acide libre.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mélange A. Alcalinité à la phtaléine du phénol.	2 A+B	2 B+A	B Milieu normal.	2 B+C	2 C+B	C Acidité au méthylorange.	C+nHCl	C+2nHCl

J'ai alors constaté, *et ce fait est vrai pour toutes les matières protéiques sur lesquelles j'ai opéré,* que la digestion se fait également bien dans tous les tubes 1 à 4, un peu moins bien dans 5, faiblement dans 6, plus du tout dans 7, 8, 9. L'actinodiastase ne renferme donc pas de représentant de la classe des pepsines où l'action n'a lieu que quand on dépasse l'acidité telle qu'elle existe dans le mélange 7 (présence d'acide libre). Elle agit en milieu alcalin, neutre, et aussi en milieu faiblement acide (présence de phosphates acides) ; ce dernier correspond à la réaction que nous avons notée dans les vacuoles digestives où le tournesol *dissous* vire au lilas. L'opinion des auteurs (Fredericq, Krukenberg, Chapeaux) qui ont déclaré que l'actinodiastase se rapproche des trypsines, et celle de ceux (Metchnikoff, Chapeaux) qui ont noté la réaction acide des vacuoles digestives sont donc parfaitement conciliables. En réalité, l'actinodiastase a une zone d'action assez étendue, relativement à la réaction du milieu, et, *in vivo*, elle paraît agir seulement dans des conditions d'acidité.

Il serait évidemment très intéressant d'étudier de la même façon la diastase des Protozoaires (Rhizopodes et Infusoires) qui, nous le savons par de nombreux travaux, agit en milieu acide. Peut-être cette diastase, *in vivo*, agit-elle aussi en milieu alcalin

et s'éloigne-t-elle ainsi des pepsines pour se rapprocher, comme l'actinodiastase, des trypsines.

Quelle place l'actinodiastase doit-elle occuper au milieu des nombreuses diastases protéolytiques que l'on classe au voisinage de la trypsine des mammifères? Si l'on considère la gamme des milieux à réaction différente, on peut, en mettant en évidence le caractère de chaque réaction, l'écrire :

1	2	3	4	5	6	7
Alcalinité à la phtaléine du phénol.	Neutralité à la phtaléine.	Alcalinité au tournesol.	Neutralité au tournesol.	Acidité au tournesol.	Neutralité au méthyl-orange.	Acidité au méthyl-orange.

L'action optima de la trypsine des mammifères correspond à la partie gauche de cette gamme, celle de la protéase de l'*Aspergillus niger* (Malfitano) à la partie droite. Celles de la papaïne et de l'actinodiastase se trouvent vers le milieu, la première un peu vers la droite, la seconde un peu vers la gauche. Donc, au point de vue de la réaction du milieu, l'actinodiastase se place entre la papaïne et la trypsine des mammifères. Nous verrons, dans les pages suivantes, à préciser cette place de l'actinodiastase.

B. *Produits de la digestion protéique.* — Dans beaucoup de mes expériences, je me suis contenté, pour comparer les actions de certains liquides diastasiques ou du même dans des conditions variées, d'observer l'action dissolvante exercée soit sur la gélatine, soit sur la fibrine, soit sur les caillots sanguins. Il est indispensable de savoir si l'action s'arrête là ou bien si, après dissolution des matières albuminoïdes, il y a peptonisation de ces matières. Il est commode, pour cette recherche, d'employer la fibrine. Mais certaines précautions sont indispensables; il faut éviter l'auto-digestion chloroformique de la fibrine, et pour cela il suffit de la chauffer 2 heures à 58° [1]. Il est vrai qu'on peut toujours, en employant un tube témoin (où la diastase est remplacée par une égale quantité d'eau de mer ou de diastase bouillie) se rendre compte de la nature ou de la quantité de produits dus à l'action des diastases de la fibrine. Les opérations ont été faites à 36°, température qui, comme je le montrerai

1. Ce détail précis m'a été donné par mon collègue Delezenne; il a son importance, car, en chauffant moins longtemps ou à une température plus basse, toute la diastase « collée » à la fibrine n'est pas détruite; en chauffant plus haut, la fibrine commence à *cuire*.

dans le paragraphe suivant, est une température voisine de celle de l'optimum d'action.

Dans ces conditions, en mettant 1 c. c. de diastase (provenant par conséquent de 0 gr. 1 de filaments mésentériques) en présence de 1 gramme de fibrine de porc chauffée 2 heures à 58°, on a une dissolution complète de toute la fibrine en moins de 24 heures. Au bout de quelques jours, le liquide de digestion ne précipite plus par l'acide chlorhydrique : à l'ébullition, on a un précipité assez faible; il en est de même du précipité par le sulfate d'ammoniaque à chaud. On a finalement, par filtration, un liquide teinté de jaune qui donne la réaction des matières albuminoïdes : coloration en jaune par l'acide azotique, réaction de Millon, réaction du biuret. Il contient donc de la peptone. En vérité, elle n'est jamais très abondante. La réaction du biuret ne donne jamais une coloration franchement rose; on reste toujours dans les tons violet ou violet lilas [1].

J'ai comparé ce liquide avec ceux produits, d'une part, par la digestion trypsique (pancréatine du commerce), d'autre part par la diastase *bouillie* laissée le même nombre de jours en contact soit avec de la fibrine chauffée 2 heures à 58° (alors action nulle), soit avec de la fibrine non chauffée.

Pour un même pouvoir *dissolvant*, la pancréatine a un pouvoir *peptonisant* nettement supérieur à celui de l'actinodiastase (la réaction du biuret est beaucoup plus nette). En revanche, l'actinodiastase est supérieure comme action aux diastases que la fibrine entraîne avec elle. La diastase bouillie, laissée au contact de fibrine chauffée à 58°, ne dissout pas la fibrine et le liquide ne renferme que des traces insignifiantes de peptone.

La supériorité de la pancréatine sur l'actinodiastase se manifeste encore par le pouvoir de dislocation de la molécule albuminoïde. Au bout de quelques jours, il se dépose, dans le liquide de digestion pancréatique, des cristaux de tyrosine tout à fait

1. Tout dernièrement, Hahn et Geret (*Zeitschr. f. Biologie*, XL, 1900, p. 118), ont fait connaître les caractères d'une endotrypsine des levures qui ne produit pas du tout de peptone; en revanche, elle donne beaucoup de leucine et de tyrosine. On a donc les mêmes produits que dans les autodigestions chloroformiques de certains organes de mammifères (Salkowsky). — Au point de vue de la réaction du milieu, l'endotrypsine des levures a son optimum d'action pour la même acidité que la pepsine; mais, au contraire de la pepsine, elle agit aussi en milieu faiblement alcalin. — Cette diastase et aussi d'autres diastases végétales (liquide des urnes des plantes insectivores, d'après Vines, etc.) présentent donc un curieux mélange des caractères des pepsines et des trypsines.

caractéristiques, qui bientôt sont reconnaissables à l'œil nu. Il n'en est jamais ainsi avec les digestions actinodiastasiques. Il faut évaporer le liquide pour y déceler la présence de tyrosine[1] ; il en est de même dans les autodigestions de fibrine. Mais nous avons toujours eu une réaction très nette avec les digestions actinodiastasiques (aussi nette qu'avec les digestions pancréatiques) en employant l'eau de brome, réactif très préconisé dernièrement par V. Harlay[2] pour distinguer les digestions trypsiques des digestions pepsiques. En ajoutant goutte à goutte l'eau de brome dans le liquide de digestion, on a une coloration rose qui vire peu à peu au violet; il y a, en même temps, précipitation et, au bout d'un certain temps, le liquide redevient clair et presque incolore (la matière violette s'est déposée). Cette réaction, toujours négative avec les produits de digestion pepsique, caractérise non la tyrosine, mais un corps mal connu, *tryptophane*, *bromkörper* ou *protéinochromogène*, qui, dans toutes les digestions étudiées jusqu'ici, accompagne d'une façon constante la tyrosine.

L'eau de brome m'a fourni les mêmes résultats avec les produits de digestion pancréatique et actinodiastasique ; la réaction est moins nette avec les produits d'autodigestion de la fibrine (elle est sans doute comparable à celle obtenue par V. Harlay avec les produits de digestion papaïnique); elle est nulle avec le liquide contenant la diastase chauffée qui a été au contact de la fibrine chauffée.

Cette réaction, par sa grande simplicité, sa parfaite netteté, la possibilité qu'elle donne d'agir sur de très faibles quantités de liquides, m'a été très utile[3].

Je n'ai pu tirer un aussi bon parti de la tyrosinase que G. Bertrand a très aimablement mise à ma disposition : l'actinodiastase prend elle-même la coloration rose, puis noire, révélatrice de la tyrosine! Pourtant j'ai noté que la réaction était

1. Les sphéro-cristaux de petite taille que l'on obtient ainsi par évaporation ne sont pas aussi caractéristiques que les grosses masses cristallines, en éventail, des digestions pancréatiques; mais leur très faible solubilité dans l'eau, leur forte solubilité à la fois dans l'ammoniaque et dans les acides, la réaction de Millon ne laissent aucun doute sur leur nature; il s'agit bien de tyrosine.

2. V. Harlay, *Thèse de doctorat de l'École supérieure de Pharmacie*, Paris, 1900, p. 79-90.

3. Elle donne également des résultats très nets avec les produits de digestion du lait par l'actinodiastase.

plus rapide avec les produits de digestion pancréatique ou actinodiastasique qu'avec les tubes témoins. La tyrosinase que j'ai employée est celle dont Bertrand a indiqué la préparation en 1896 (*Bull. Soc. chimique de Paris*, t. XV. p. 1218). Malgré une origine aussi ancienne, elle s'est montrée encore très active.

En résumé, par les produits de son action, l'actinodiastase se rapproche encore des trypsines : comme elles, elle ne se contente pas d'arriver au stade peptone, elle produit un commencement de dislocation des molécules albuminoïdes ; mais pour une égalité de pouvoir dissolvant, elle a une action peptonisante et dislocante de la molécule albuminoïde moindre que la pancréatine.

C. *Action de la température sur l'action protéolytique.* — La plupart de mes expériences ont été, comme je l'ai déjà dit, effectuées à 36°. C'est en effet une des températures où la diastase agit le mieux. A 38°, l'action est peut être un peu plus rapide, mais la différence est faible et l'on peut dire que c'est entre 36 et 45° que se trouve l'optimum pour l'action de l'actinodiastase : à 50°, l'action de la diastase est sensiblement nulle.

Mais cette diastase agit aussi à des températures plus basses. Entre 10 et 20°, son action est des plus nettes. Ainsi 1/10 c. c. d'actinodiastase (correspondant à 1 centigramme de filaments mésentériques) amène la dissolution complète de 20 centigrammes de fibrine de porc (chauffée 3/4 d'heure à 56°) en 20 heures, à la température de 18° C. — A des températures inférieures à 10°, la diatase agit encore, mais plus lentement. Ainsi, à la glacière (entre 5 et 8°), 1/2 gramme de fibrine a été en grande partie dissoute par 1/2 c. c. de diastase ; mais il a fallu un mois. L'examen des produits de digestion révèle encore la présence de peptone (coloration rose violacé au biuret). Après action à 15°, la réaction du brome avec le liquide de digestion est assez intense : à 5-8°, elle est à peu près nulle au bout d'un mois, mais commence à apparaître nettement après deux mois.

Ces faits sont importants à constater, car la température d'action physiologique de l'actinodiastase, dans nos pays, est toujours assez basse. Elle ne dépasse guère 15-20° l'été et 0° l'hiver. Il est probable que les actinies, pendant la mauvaise saison, restent de longs mois sans assimiler de nourriture.

D. *Action de la température sur la diastase.* — Une température

de 100° supprime en quelques minutes toute l'activité de l'actinodiastase. J'ai cherché à déterminer à quelle température l'actinodiastase est détruite. Je soumettais l'extrait diastasique dilué dans trois fois son volume d'eau de mer pendant 3/4 d'heure à l'action de diverses températures : 56°, 58° ou 64°.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

0cc,1	extrait diastasique	non chauffé dissout 20 cgr.	fibrine de porc (chauffée)	en 20h à 18°.
0,1	—	chauffé à 56° — 5 cgr.	—	—	en 36h à 18°.
0,1	—	ch. à 56° diss. part. 10 et 20 cgr.	—	—	—
0,1	—	ch. à 58° dissout partiellem. 5 cgr.	—	—	—
0,1	—	ch. à 64° n'agit pas sur 5 cgr.	—	—	—

Une autre diastase non diluée, chauffée 1 heure à 56°. avait perdu à peu près totalement son pouvoir protéolytique. Nous verrons plus loin que la même diastase avait gardé environ 1/20 de son pouvoir présurant primitif et presque tout son pouvoir lipasique.

Ces résultats que nous avons vérifiés à maintes reprises prouvent que les protéases de l'extrait diastasique sont complètement détruites entre 55 et 60°, c'est-à-dire à une température relativement basse.

E. *Détail de l'action de l'actinodiastase sur divers albuminoïdes.* — J'ai essayé l'action de l'actinodiastase sur un grand nombre de matières albuminoïdes : albumine cuite, caséine, muscles d'animaux variés, hématies, caillots et fibrines d'un grand nombre d'animaux. Ces essais, en dehors de leur intérêt propre, m'étaient indispensables comme préface aux expériences de régime alimentaire dont je rendrai compte dans un chapitre suivant. — Ils nous ont montré que l'actinodiastase agit très différemment sur le même tissu suivant l'animal dont il provient. Ceci est net pour les muscles et surtout pour les caillots. J'ai été ainsi amené à me demander à quoi tiennent ces différences et j'ai été conduit à étudier l'action des sérums et à reconnaître leur pouvoir empêchant, variable d'ailleurs suivant l'espèce animale dont ils proviennent, vis-à-vis de l'actinodiastase.

Action sur le tissu musculaire. — L'actinodiastase agit d'une façon assez active sur les muscles de crustacés, crevette (*Crangon vulgaris*) et écrevisse : 1 c. c. d'extrait dissout complètement 40 centigrammes de muscle d'écrevisse en 15 heures à 36°. — Elle est beaucoup moins active sur les muscles de Vertébrés;

ainsi, dans les mêmes conditions expérimentales, la même diastase ne dissolvait que 10 à 15 centigrammes de muscles de brochet, et encore beaucoup moins de muscles de mammifères (lapin, etc.). Bien entendu, dans toutes ces expériences, les muscles étaient finement hachés de façon à détruire les barrières conjonctives qui peuvent gêner la pénétration de la diastase, et par conséquent à obtenir une action maxima.

A quoi tiennent ces différences d'action? Comme il s'agit de muscles d'animaux fort éloignés zoologiquement, on peut les attribuer à des différences morphologiques ou chimiques; mais on peut songer aussi à l'existence soit de substances empêchantes, soit de substances favorisantes, qu'entraîne avec elle la substance musculaire. Il ne peut s'agir de l'intervention de diastases fixées sur le muscle, car ces tissus, placés dans l'eau de mer ou dans le mucus gastrique d'actinies, ne subissent pas de protéolyse appréciable. Mais il est possible qu'il y ait intervention de substances antidiastasiques; le muscle est en effet toujours imbibé de sang et je montrerai plus loin que ce sang renferme de l'antidiastase plus active chez les mammifères que chez l'écrevisse. Néanmoins cette cause empêchante n'est pas à elle seule suffisante pour expliquer les différences observées; elles tiennent en grande partie à la constitution même de la fibre musculaire.

Action sur les éléments du sang. — J'ai étudié l'action de l'actinodiastase sur les divers éléments du sang, hématies, caillot et fibrine.

L'actinodiastase ne montre jamais d'action agglutinante sur les hématies; mais elle exerce une action dissolvante. Les phénomènes que l'on observe, en faisant l'expérience en goutte pendante, rappellent de très près ceux que j'ai décrits à l'intérieur des cellules digestives des actinies[1]. Il y a encore mise en sphère du globule (j'ai surtout suivi le phénomène avec les hématies d'oie et de poule); ce n'est que quand le globule est devenu sphérique que la diffusion de l'hémoglobine se fait. La membrane et le noyau persistent et on peut, en diaphragmant très

1. Pour observer le phénomène dans de bonnes conditions, il faut employer un extrait très concentré (par exemple : 2 c. c. d'eau de mer pour 1 gramme de filaments mésentériques); on mélange une partie de sang défibriné avec 2, 4 ou 6 de cet extrait; on a alors mise en boules complète des globules au bout de 2-3 heures, dissolution partielle de l'hémoglobine au bout de quelques heures, dissolution complète en moins de 24 heures (Température 15-20°).

fortement, les reconnaître au microscope[1]. La membrane a été évidemment touchée dès le début de l'action, avant toute diffusion d'hémoglobine : l'hématie n'est devenue sphérique que parce que son enveloppe, de rigide qu'elle était, est devenue molle et plastique et « les forces qui ont agi pour réaliser cet état sphérique sont les mêmes forces de tension superficielle qui arrondissent une goutte d'huile dans l'eau ». (Duclaux, *Microbiologie*, t. II, p. 720).

Il y a évidemment là un phénomène analogue à celui connu en bactériologie sous le nom de phénomène de Pfeiffer.

Dans l'eau de mer ou *dans la diastase chauffée* 1/2 *heure à* 56°, des phénomènes semblables se produisent, mais avec une intensité incomparablement moindre que dans l'actinodiastase non chauffée. Au point de vue de la perte des propriétés hémolytiques, l'actinodiastase se comporte donc comme une alexine.

L'action dissolvante de l'actinodiastase vis-à-vis des globules de divers mammifères et oiseaux est sensiblement la même. Il n'en est pas de même de son action dissolvante sur les caillots de diverses espèces animales.

On observe, à cet égard, des différences considérables. J'ai expérimenté sur les caillots de tortue, — de poule, de pigeon et d'oie, parmi les oiseaux, — de lapin, de rat, de chien, de cobaye, de mouton et de chèvre parmi les mammifères.

Sur tous ces caillots, sauf les deux derniers, l'actinodiastase exerce une action dissolvante assez intense. Ainsi, 1/8 c. c. d'extrait est capable de dissoudre, en 20-24 heures à 36°, 0gr,05 de caillot d'oie ou de lapin. En revanche, son action sur les caillots de chèvre et de mouton est extrêmement faible ; dans les conditions expérimentales indiquées, au bout de 20 heures, l'action est presque nulle. Le caillot de cobaye occupe une place intermédiaire entre les deux catégories.

J'ai donc été amené à me poser le même problème qu'avec le tissu musculaire. A quoi tiennent ces différences d'action? Les caillots sont composés surtout d'hématies et j'ai montré que

1. Dans les extraits acidifiés où la réaction est voisine de celle de l'acidité au méthylorange, l'action dissolvante est moins intense. De plus, il y a rupture de la membrane et le noyau des hématies d'oiseaux fait hernie à l'extérieur : on a des formes en massue très curieuses. On n'observe rien de semblable *in vivo*. La concordance des figures de transformation des globules *in vivo* et dans l'extrait neutre ou acide seulement au tournesol est un argument de plus en faveur de la conclusion que j'ai déduite de l'étude de l'ingestion de tournesol par les actinies : à savoir la réaction *faiblement* acide du contenu des vacuoles.

le pouvoir dissolvant vis-à-vis de ces éléments est sensiblement indépendant de l'espèce animale. Il est vrai que l'action dissolvante vis-à-vis des diverses fibrines présente des variations (ainsi la fibrine de mouton est un peu moins facilement dissoute que celle de porc ou de lapin); mais cette fibrine est en si faible quantité dans un caillot que les différences observées ne peuvent reconnaître cette cause. J'ai été ainsi amené à me demander si les caillots de mouton et de chèvre (et aussi les fibrines) n'entraînent pas du sang avec eux, des substances qui entravent l'action de l'actinodiastase.

Action antidiastasique des divers sérums. — Si l'hypothèse que je viens de formuler est exacte, on doit : 1° rendre cette insolubilisation des caillots encore plus grande en ajoutant à l'extrait diastasique une certaine quantité de sérum du même animal (chèvre ou mouton); 2° rendre les caillots d'autres animaux peu solubles en ajoutant à l'extrait diastasique du sérum de chèvre ou de mouton. C'est ce que l'expérience vérifie.

A un liquide contenant 1/8 c. c. d'actinodiastase, on ajoute 1/10 c. c. de sérum de mouton, et on fait agir ce mélange sur 5 centigrammes de caillots de divers animaux, mouton, oie, pigeon et lapin. Après 24 heures à 36°, le caillot de mouton est resté à peu près inaltéré ; des caillots des autres animaux, un quart à peine est dissous. La même quantité d'actinodiastase, additionnée d'eau salée physiologique au lieu de sérum, amène dans les mêmes conditions expérimentales une dissolution complète des caillots d'oie, de pigeon et de lapin, et dissout un quart du caillot de mouton.

Ce point acquis, il fallait se demander si ce pouvoir antiactinodiastasique des sérums de mouton et de chèvre est particulier à ces sérums ou bien n'existe pas à un degré plus faible chez les sérums d'autres animaux.

J'ai expérimenté avec divers sérums de mammifères et d'oiseaux (lapin, rat, chien, oie) et j'ai constaté que ces divers sérums exercent une action antidiastasique, mais moindre que celle des sérums de mouton et de chèvre. Ainsi, dans une expérience dont les conditions ont été calquées sur celles de la précédente, au bout de 24 h. à 36°, alors qu'il y avait une dissolution complète du caillot de lapin et un commencement de dissolution du caillot de mouton dans les tubes témoins, que l'action était très faible sur le caillot de lapin et nulle sur le caillot de mouton dans les tubes avec 1/10 c. c. sérum mouton, la dissolution du caillot de lapin était très avancée, mais non complète,

et celle du caillot de mouton légèrement commencée dans les tubes avec 1/10 c. c. sérum lapin. Dans d'autres expériences, l'action antidiastasique du sérum de lapin s'est montrée plus forte que dans l'expérience que je viens de résumer ; mais, dans tous les cas, elle est notablement plus faible que celles des sérums de mouton et de chèvre.

Ces expériences prouvent donc qu'il y a un rapport entre la difficulté de dissolution d'un caillot et le pouvoir antidiastasique du sérum du même animal. Elles prouvent aussi que les antidiastases des divers sérums n'ont rien de *spécifique*, puisqu'elles se manifestent, avec la même intensité, non seulement pour empêcher la dissolution du caillot du même animal, mais encore des autres espèces.

Comme il fallait s'y attendre, le pouvoir antidiastasique des divers sérums se révèle non seulement vis-à-vis de l'action de l'actinodiastase sur les caillots sanguins, mais encore sur les diverses substances protéiques dont nous avons étudié la dissolution, muscles divers, fibrines. En étudiant l'action de l'actinodiastase sur le lait, je mettrai en évidence l'action antiprésurante et anticaséolytique des divers sérums.

A propos de l'action empêchante des sérums vis-à-vis de la digestion des muscles, j'ai étudié les sérums d'écrevisse et d'escargot. Tous deux, surtout le premier, ont montré un certain pouvoir antidiastasique, mais beaucoup plus faible que celui des vertébrés. Ces sérums n'ont aucun pouvoir empêchant *spécifique* contre la digestion des muscles d'écrevisse ou d'escargot ; ce pouvoir se manifeste avec le même degré, c'est-à-dire plus faiblement que celui des vertébrés, sur ces muscles que sur les muscles de mammifères.

Pour pousser plus loin l'étude de l'antidiastase des sérums, j'ai opéré constamment avec de la fibrine de porc chauffée à 58° pour la débarrasser des diastases qu'elle entraîne du sang. Je dois dire que le sens général des résultats est sensiblement le même avec la fibrine non chauffée. Vis-à-vis de la fibrine de porc chauffée, les divers sérums manifestent leur pouvoir antidiastasique, et ceux de mouton et de chèvre se montrent beaucoup plus antidiastasiques que les autres. Notons que le sérum de cheval occupe un rang moyen.

Jusqu'ici je ne me suis préoccupé que de l'action antidis-

solvante des sérums; il y a en même temps et à un degré correspondant action antipeptonisante. On peut s'assurer facilement que la digestion des fibrines n'est pas poussée très loin, en présence des sérums, en faisant l'épreuve dont j'ai parlé à l'eau de brome.

Quelle est la substance qui détermine l'action antidiastasique des sérums? J'ai démontré que :

1° Les mélanges actinodiastase-sérum employés ont, avant comme après l'action digestive, une réaction comprise entre l'alcalinité à la phtaléine du phénol et la neutralité au tournesol; c'est-à-dire qu'on est toujours dans les conditions les meilleures pour l'action de l'actinoprotéase;

2° Les mélanges actinodiastase-eau physiologique agissent comme l'actinodiastase seule;

3° La chaleur fait disparaître le pouvoir antidiastasique des sérums; à 55°, il est déjà atteint; à 68°, il a à peu près complètement disparu.

Je crois donc pouvoir conclure qu'il existe dans les sérums une *antidiastase*, au sens que l'on attribue à ce mot dans le cas, par exemple, de l'*antiprésure* de Morgenroth et Briot.

Cette notion d'une antidiastase protéolytique n'est pas nouvelle[1]; déjà certains savants ont montré que le sérum des vertébrés renferme une substance qui contrarie l'action protéolytique de la pancréatine, et Landsteiner a même voulu établir certaines relations entre la trypsine du pancréas d'une espèce animale et l'antitrypsine de la même espèce.

Jusqu'ici, on a surtout rapproché ces substances empêchantes des diastases. Mais si l'on remarque qu'il faut dépasser la température de 60° pour les détruire, si l'on considère leur mode d'action, il me semble plus logique de les comparer aux *sensibilisatrices* de Bordet et Ehrlich, et de leur donner le nom d'*insensibilisatrices*, pour indiquer que leur action est exactement contraire à celle des *sensibilisatrices*. Elles se rapprochent surtout des *anticytotoxines* et des *antialexines*.

Mes expériences mettent en évidence une différence notable entre les quantités d'antidiastase renfermées dans les divers

1. Voir la bibliographie dans Landsteiner, *Centralbl. f. Bakt., Abth.* I, XXVII, 1900; ajouter Camus et Gley, *Société de Biologie*, 1897, p. 825, et *Arch. de physiologie*, 5e série, t. IX, p. 764, 1897.

sérums. Ces faits me paraissent susceptibles de jeter quelque lumière sur certains résultats des expériences de De Marbaix et Denys, sur la digestion chloroformique. Ces savants ont, en effet, divisé les sangs sur lesquels ils ont opéré en deux catégories : ceux capables de se digérer eux-mêmes (les sangs de chien et de lapin font partie de cette catégorie); ceux qui restent inaltérés (exemple : le sang de mouton). Le sérum de mouton non seulement ne digère pas sa propre fibrine, mais encore il n'agit pas sur les fibrines qui sont digérées par leur propre sérum. En revanche, l'action digestive des fibrines a lieu dans le sérum de mouton porté à l'ébullition. Il y a donc, dans ce sérum de mouton (et mes expériences prouvent la réalité de cette interprétation), une antidiastase en quantité suffisante pour s'opposer à la digestion de la fibrine par les diastases qu'elle entraîne avec elle. Mais pourquoi les fibrines des divers animaux sont-elles digérées par les sérums de lapin, chien, etc.? Il est certain que ces sérums renferment beaucoup moins d'antidiastases que celui de mouton, et qu'ainsi la diastase qu'ils contiennent est moins fortement gênée dans son action. Ils peuvent en effet digérer, quoique faiblement, de la fibrine de porc chauffée à 58°. Mais comment se fait-il que les sérums, employés seuls, manifestent des actions diastasiques, alors que, mélangés à l'actinodiastase, ils se montrent antidiastasiques? Ce ne sont pas les seules énigmes que j'aie rencontrées sur mon chemin. Ainsi, certains sérums, surtout ceux peu antidiastasiques, manifestent *souvent* leur action empêchante à une certaine dose mieux qu'à une dose plus forte. Pour fixer les idées, je citerai le sérum de cheval qui, *dans plusieurs expériences* où le liquide contenait 1/8 c. c. d'actinodiastase et 10 centigrammes de fibrine de porc chauffée à 58°, s'est montré très antidiastasique à la dose de 1/4 c. c. et beaucoup moins à la dose de 1/2 c. c. et de 1/10 c. c. Chercher à résoudre ces problèmes eût été sortir complètement de mon sujet et je m'en tiens, dans ce mémoire, au fait bien établi de la variation du pouvoir antidiastasique avec les divers sérums.

Action sur l'albumine coagulée et la fibrine cuite. — Il faut chauffer la fibrine pour la débarrasser des ferments qui y sont attachés. Mais si on dépasse 60°, elle devient dure, cassante; elle subit un commencement de cuisson. Cette fibrine, ainsi

chauffée, est moins facilement digérée que la fibrine qui n'a pas subi une semblable action.

Cette digestion n'est jamais complète; néanmoins, la plus grande partie de la fibrine est dissoute et j'ai vérifié qu'il y avait peptonisation; de plus, le liquide de digestion réagit à l'eau de brome.

C'est dans la même catégorie qu'il faut placer l'action de l'actinodiastase sur l'albumine coagulée. J'ai opéré sur de l'albumine finement émulsionnée, préparée par M. Malfitano par un procédé un peu différent de celui d'Effront (coagulation à température plus basse). L'albumine, étant en grains extrêmement fins, est plus facilement attaquée que dans les tubes de Mette. Dans ces conditions, j'ai constaté que l'actinodiastase exerce une action très nette sur l'albumine coagulée. Ainsi 1/8 c. c. de diastase (correspondant à $1^{cgr},25$ de filaments mésentériques), en 24 heures, à 36°, dissout complètement l'albumine de 1 c. c. d'une solution à 1 pour 5. Ce pouvoir dissolvant est donc assez considérable. Je l'ai comparé à celui de la pancréatine. J'ai employé deux solutions de pancréatine dans l'eau de mer, l'une sensiblement neutre au tournesol, l'autre à la limite de l'alcalinité à la phtaléine du phénol. Ces deux solutions de pancréatine et une solution d'actinodiastase, à volumes égaux, dissolvaient à peu près de la même façon la fibrine de porc; les deux solutions de pancréatine se sont à peu près comportées de même sur l'émulsion d'albumine; la solution d'actinodiastase s'est montrée plus active. L'actinodiastase a donc une action décoagulante plus énergique que la trypsine.

Cette propriété est importante pour préciser la place de l'actinoprotéase parmi les diastases protéolytiques: elle la rapproche des trypsines et l'éloigne des diastases, telles que la protéase de l'*Aspergillus niger* et la papaïne, dont l'action décoagulante est toujours faible.

En résumé, l'actinodiastase est capable d'agir sur presque toutes les catégories de matières albuminoïdes. Son actinoprotéase est donc une substance complexe, ou, ce qui est mieux d'accord avec les données actuelles de la science, un mélange de diastases : fibrinase, gélatinase, hémolysine, diastase décoagulante et caséase (comme nous le verrons dans le chapitre suivant).

V

ÉTUDE DES AUTRES ENZYMES DE L'ACTINODIASTASE

Les diastases protéolytiques ne sont pas les seules que renferme l'extrait des filaments mésentériques d'actinies. J'y ai encore mis en évidence la présence de présure, de lipase et d'amylase.

A. Présure. — En ajoutant à du lait chloroformé une quantité suffisante d'actinodiastase, et en portant le mélange à une température de 30-45°, on le voit se prendre rapidement.

Expérience à 34°,5.

1/2 c. c.	d'extrait	coagule	2 c. c.	lait en.....	20′
1/4 —	—	—	—	.....	35′
1/10 —	—	—	—	.....	1h,40′
1/20 —	—	—	—	.....	2h,5′

Quand la quantité de liquide que l'on ajoute au lait n'est pas supérieure à 1/2 ou même à 1 c. c. pour 2 de lait, le lait se prend en masse et, par rétraction, on a un caillot dur. Mais quand on est obligé d'ajouter plus de 1 c. c. de liquide (par exemple dans les expériences avec les sérums dont je parle plus loin), au lieu d'une prise en masse, on a une véritable agglutination et le culot de caséine se fait mal et lentement.

On a de même une agglutination quand on fait agir l'actinodiastase à basse température. Au point de vue de l'action de la température, l'actinodiastase (agissant dans un milieu sans trace d'acidité) présente une particularité sur la présure retirée des mammifères, c'est qu'elle agit au-dessous de 15°.

Expérience. — On prend une série de tubes renfermant chacun 2 c. c. de lait et 1/2 c. c. de diastase, et on les porte à diverses températures.

A 48°	la coagulation	se fait	en.....	8′
38°	—	—	.....	10′
35°,5	—	—	.....	12′
20°	—	—	.....	45′
15°	—	—	.....	1h,15′
8-9°	—	—	.....	3h,30′
6-7°	—	—	.....	4h

Mais, dans ces deux derniers tubes, au bout de 24 heures, on a simplement un dépôt des particules de caséine agglutinées, dépôt tantôt dans le fond du tube, tantôt à la partie supérieure, suivant la quantité de globules gras entraînés.

A 50° l'action est aussi intense qu'à 48°; mais à partir de cette température, elle baisse rapidement. Une heure de chauffage à 56° détruit presque toute la présure de l'actinodiastase : 1 c. c.

d'une pareille présure chauffée agit à peine mieux que 1/20 c. c. de diastase non chauffée. A 64°, tout pouvoir présurant disparaît.

J'ai cherché quel était le pouvoir antiprésurant des divers sérums envers l'actinoprésure.

Voici le résumé d'une expérience où chaque tube recevait 2 c. c. de lait, 1/2 de diastase et une quantité variable de divers sérums; la température d'action était 35°.

I. — *Sérum de chèvre.* —	1/2 c. c. sérum.	0 coagulation.		
	1/4 —	+ 1/4 eau physiol.	0 coagulation.	
	1/10 —	+ 4/10 —	Coagul. en 4h.	
II. — *Sérum de mouton.* —	1/2 c. c. sérum.	0 coagulation.		
	1/4 —	+ 1/4 eau physiol.	0 coagulation.	
	1/10 —	+ 4/10 —	Coagul. en 3h10′.	
	1/20 —	+ 1/2 —	—	50′.
III. — *Sérum de cheval.* —	1/2 c. c. sérum.	0 coagulation.		
	1/4 —	+ 1/4 eau physiol.	0 coagulation.	
	1/10 —	+ 4/10 —	Coagul. en 5h15′.	
	1/20 —	+ 1/2 —	—	50′.
IV. — *Sérum de lapin.* —	1/2 c. c. sérum.	0 coagulation.		
	1/4 —	+ 1/4 eau physiol.	0 coagulation.	
	1/10 —	+ 4/10 —	Coagul. en 2h10′.	
V. — *Sérum de poule.* —	1/2 c. c. sérum.	Coagulation en 50′.		
	1/4 —	+ 1/4 eau physiol.	Coagul. en 40′.	
	1/10 —	+ 1/4 —	—	35′.
IV. — *Sérum d'oie.....* —	1/2 c. c. sérum.	Coagulation en 2h10′.		
	1/4 —	+ 1/4 eau physiol.	Coagul. en 1h10′.	
	1/10 —	+ 4/10 —	—	50′.
Témoin..... —	1/2 eau physiol.	Coagulation en 30′.		

Cette expérience donne une idée du pouvoir antiprésurant des divers sérums [1]. On retrouve au premier rang, pour leur action empêchante, les sérums de chèvre et de mouton; mais ici, le sérum de cheval est au moins aussi empêchant. Le sérum de lapin n'est guère moins empêchant que les précédents. En revanche, les sérums d'oiseaux (poule et oie) sont relativement peu antiprésurants. Cette échelle des pouvoirs antiprésurants diffère, à certains égards, de celle des pouvoirs antiprotéolytiques. Néanmoins, je le répète, les sérums de chèvre et de mouton sont encore au premier rang. Et cette analogie dans les deux échelles apparaît très importante, si l'on examine l'échelle des pouvoirs empêchants des divers sérums vis-à-vis de la *présure de Hansen*, telle qu'elle a été dressée par Briot [2]. Le

1. J'ai opéré avec plusieurs sérums de chaque espèce animale et avec divers extraits. Les sérums ne se sont pas toujours montrés aussi antiprésurants. Ainsi, avec le *même* lait et deux diastases doués du *même* pouvoir coagulant, les *mêmes* sérums se sont montrés très différemment antiprésurants vis-à-vis de l'une et l'autre diastase! Ce qui reste constant, c'est l'échelle de pouvoir antiprésurant.

2. Briot, *Thèse pour le doctorat ès sciences naturelles*, Paris, 1900.

mouton et la chèvre sont des derniers sur la liste de Briot, et ils sont des premiers sur la mienne. Le seul caractère commun aux deux échelles est la première place occupée par le sérum de cheval.

En résumé, les différences entre les deux échelles de pouvoir antiprésurant des sérums vis-à-vis du lab des mammifères d'une part et de celui des actinies de l'autre, et surtout le fait que ce dernier lab agit encore, quoique très lentement, à basse température, m'amènent à conclure que l'actinodiastase renferme une variété particulière de présure et justifient la création d'un nom spécial, *actinoprésure*, pour la désigner.

L'actinodiastase renferme aussi une caséase. Le culot de caséine des tubes de lait portés au voisinage de 35°, disparaît en grande partie (jamais complètement) en 24 ou 48 heures. Les divers sérums sont également empêchants vis-à-vis de cette solubilisation de la caséine; dans les tubes de lait qui renferment du sérum, la dissolution du caillot est toujours notablement moindre que dans les tubes témoins. Le liquide de digestion du lait réagit nettement à l'eau de brome. On a encore une réaction, mais faible, au bout d'un mois de contact à 15°; à 6°, la réaction est insignifiante.

B. Lipase. — Willem et Chapeaux ont nettement observé l'absorption des matières grasses par les cellules digestives des actinies et ils ont constaté ensuite leur disparition graduelle. Il existe donc certainement dans les vacuoles digestives des actinies une diastase capable de solubiliser les graisses. Sur la présence de cette diastase dans l'extrait des actinies, on n'a jusqu'ici que l'observation de Chapeaux qui dit que cet extrait produit le dédoublement de l'huile d'olive, sans donner aucun détail sur son mode opératoire.

J'ai étudié avec soin l'action de l'actinodiastase sur les matières grasses. J'ai d'abord opéré avec des émulsions : lait d'amandes, sérum d'oie très lactescent; mais les résultats obtenus ont été très peu nets et inconstants; quand l'acidité du mélange augmentait, ce qui se produisait généralement, c'était de quantités insignifiantes. J'ai alors recouru à la monobutyrine et j'ai obtenu des résultats d'une parfaite netteté. Le tableau suivant les résume, en même temps qu'il donne une idée de l'action de la température.

Chaque tube renferme 5 c. c. d'une solution à 1 0/0 de monobutyrine dans l'eau distillée et 1 c. c. de diastase; pour les tubes 9 à 12, la diastase a été chauffée 10 minutes à 100°. Après un ou deux jours d'action, on ajoute à chaque tube quelques gouttes de phtaléine du phénol et ensuite, goutte à goutte, une solution de soude demi déci-normale, jusqu'au virage.

Au moment du mélange, et avant toute action, il fallait 6 gouttes de soude pour amener le virage du mélange de 5 c. c. de la solution de monobutyrine et de 1 de diastase non chauffée.

Par conséquent, dans toutes les expériences, les nombres de gouttes du tableau diminuées de 6 donnent une mesure de l'acidité due à l'action de la diastase.

Tubes.	Température.	Nombre de gouttes nécessaires pour le virage.	
		Après 20 heures.	Après 44 heures.
1	38	20	»
2	38	»	24
3	34.5	15	»
4	34.5	»	19 1/2
5	19	10	»
6	19	»	13
7	6	8	»
8	6	»	10
9	38	6	»
10 (Diastase bouillie.)	38	»	6 1/2
11 (Diastase bouillie.)	6	6	»
12 (Diastase bouillie.)	6	»	6

On voit que l'actinolipase, qui agit surtout bien au-dessus de 34°, dédouble encore la monobutyrine à la glacière, à 6°. Son maximum d'action paraît être vers 40°; à 50 et à 56°, elle agit sensiblement comme à 34; à 64°,5, son action est à peu près la même qu'à 20°, c'est-à-dire qu'elle ne dépasse guère la moitié de l'action maxima. Mais il faut tenir compte qu'à ces températures la diastase est en partie détruite. En effet, en soumettant l'actinodiastase à un chauffage de 1 heure respectivement à 56 et à 64°,5 et en la faisant ensuite agir, à 38°, sur de la monobutyrine, j'ai constaté que la diastase portée à 56° avait perdu un quart de

son pouvoir, et celle qui avait été à 54°,5 près de la moitié. On remarquera que la température respecte beaucoup plus la lipase que la protéase et la présure (cf. lipase du sang des vertébrés).

C. Diastases des substances hydrocarbonées. — J'ai pu mettre en évidence, après Krukenberg et Chapeaux, la présence d'amylase dans l'extrait diastasique des actinies.

J'ai employé une émulsion à 2 0/0, dans l'eau distillée, de fécule de pomme de terre, cuite à l'autoclave.

Dans chaque tube, je mettais 5 c. c. de cette émulsion d'amidon thymolisée, et 1 c. c. soit de diastase non chauffée, soit de diastase ayant été 10 minutes à 100°, au bain-marie. Les tubes étaient placés à l'étuve de 38° et au bout de 24 et de 48 heures, je prélevais 1/2 c. c. dans chaque tube que je faisais bouillir avec le même volume de Fehling.

Tous les tubes avec diastase non chauffée ont montré un dépôt d'oxydule de cuivre révélant la présence du maltose dû à l'activité de la diastase. A la vérité, ce dépôt s'est toujours montré peu abondant, même après 48 heures d'action.

L'action amylolytique de l'actinodiastase est donc faible. Cette constatation n'a rien de surprenant si l'on réfléchit que beaucoup d'actinies vivent en symbiose avec des algues qui, évidemment, assument le rôle de pourvoir l'association des matières amylacées qui lui sont utiles et ensuite de les dédoubler en produits assimilables.

Il m'a été impossible de mettre en évidence la présence d'invertine dans l'actinodiastase. J'ai fait agir, à 38°, 1 c. c. de diastase sur 5 c. c. de solutions de sucre soit à 5, soit à 20 0/0, sans aucun résultat appréciable. Je n'ai pas réussi non plus à obtenir un sucre réduisant la liqueur de Fehling en faisant agir, à 38°, l'actinodiastase sur une solution de glycogène (cf. expériences de Willem et Clautriau [1]).

D. Oxydases. — J'ai recherché, en suivant les indications que m'a fournies M. G. Bertrand, la présence d'oxydases dans l'actinodiastase. Le résultat a été tout à fait négatif. Il y a même plus; l'émulsion dans l'eau de la teinture alcoolique de gaïac bleuit légèrement à la lumière; elle est restée d'un blanc pur dans le tube ayant reçu de l'actinodiastase; l'extrait devait donc contenir une substance réductrice.

1. Willem, *l. c.*

Je n'ai obtenu aucun bleuissement en versant directement la teinture alcoolique de gaïac sur les filaments mésentériques en place dans une actinie vivante.

E. Action sur les bactéries. — Beaucoup d'actinies renferment dans leurs cellules digestives des algues symbiotes qui ne sont nullement attaquées par les sucs digestifs. Chapeaux a noté que ces algues et d'autres vivent également bien dans l'extrait des filaments mésentériques et qu'elles s'y multiplient.

J'ai recherché si l'actinodiastase renferme une substance bactéricide. J'ai opéré avec deux espèces microbiennnes différentes : l'une était un coccus isolé de deux proies d'actinies (un crabe et un poisson) trouvées dans la cavité gastro-vasculaire d'animaux en parfait état; l'autre le vibrion cholérique. Ce dernier microbe est une des bactéries connues les plus fragiles : sa transformation facile en granules en est une preuve.

Voici les détails d'une expérience faite avec un vibrion cholérique (provenance Bombay).

Une culture de choléra sur gélose âgée de 24 heures est diluée dans 5 c. c. d'eau physiologique. Deux tubes renfermant l'un (A) 1 c. c. 5 d'une actinodiastase[1] très active (en particulier sur les substances albuminoïdes), l'autre (B) 1,5 c. c. de la même diastase chauffée 10 minutes à 100°, au bain-marie, sont ensemencés chacun avec une anse de platine de la dilution vibrionienne, puis laissés à la température du laboratoire (15° environ).

Au bout de trois quarts d'heure, 1 h. 1/2, 5 heures, 20 heures, on prélève une anse de platine dans chaque tube; on la dilue dans 5 c. c. d'eau physiologique et on ensemence sur gélose une anse de la dilution. Voici les résultats obtenus :

Prélèvements faits au bout de		3/4 heure.	1 h. 1/2	5 heures.	20 heures.
Tubes	A. Diastase non chauffée...	7 colonies.	12 colon.	50 colon.	105 colon.
	B. Diastase chauffée.....	4 —	7 —	8 —	85 —

Cette expérience montre donc que l'extrait diastasique ne renferme aucune substance bactéricide détruite par la chaleur[2];

1. La diastase utilisée était en solution chloroformique; on laissait le chloroforme s'évaporer avant de l'employer et on constatait qu'à ce moment elle était stérile.

2. J'ai opéré aussi en ensemençant ma diastase avec une dose de choléra environ 100 fois moins forte que celle de l'expérience que je décris; je n'ai encore pu constater aucun pouvoir bactéricide. En goutte pendante, dans les mélanges de diastase et de choléra, on ne constate ni immobilisation ni mise en boules des vibrions.

même à la température de 15°, il y a croissance du vibrion cholérique dans l'actinodiastase.

En mettant les tubes d'actinodiastase ensemencés de choléra à l'étuve, à 35°, on a, au bout de 24 heures, une abondante culture vibrionienne. Même à 15°, au bout de 48 heures, la culture est très appréciable. On s'en rend un compte exact en comparant, par la méthode des dilutions successives et des plaques, la contenance en vibrions d'actinodiastase à 35° et à 15° et d'eau de mer à la même température.

L'actinodiastase est donc un bon milieu de culture pour le vibrion cholérique, en opérant à 35°. Le coccus, isolé de proies d'actinies, pousse déjà très abondamment à 15° dans l'extrait diastasique; on a des cultures comparables comme intensité à celles du vibrion cholérique à 35°.

VI

RECHERCHE DES DIASTASES DANS LES DIFFÉRENTES PARTIES DU CORPS DES ACTINIES

J'ai déjà indiqué, dans le premier chapitre, que le liquide de la cavité gastro-vasculaire des actinies est dépourvu de tout pouvoir diastasique; dans le chapitre III, en faisant connaître le mode général de préparation d'extraits des différentes parties du corps d'actinies, j'ai mentionné brièvement que l'extrait de filaments mésentériques est le seul contenant des diastases en notable quantité. Il s'agit maintenant de préciser cette dernière indication.

D'un lot de 8 à 10 *Adamsia Rondeletti*, je fais les extraits des parties suivantes :

A. Filaments mésentériques;

B. Partie génitale des septa;

C. Œsophage débarrassé, autant que possible, de toutes ses connexions endodermiques;

D. Tentacules;

E. Aconties (n'a pu servir qu'à un nombre restreint d'expériences);

F. Tégument.

J'ai recherché les diastases de ces divers extraits.

Protéases. — 1 c. c. de l'extrait A dissout 1 gramme de fibrine (chauffée 2 heures à 58°) en 24 heures. L'extrait B met 3 jours à arriver à une demi-dissolution; la dissolution ne devient jamais complète. Les extraits E et C, surtout le premier, amènent la dissolution d'une très minime portion de la fibrine. L'action de D est à peine sensible; enfin, celle de F est nulle.

Le produit de la digestion par A, seul, donne une réaction nette à l'eau de brome; celui de B une réaction encore importante, mais moins intense; celui de C une très faible, ceux de D et de F une nulle.

En évaporant une petite quantité de ces divers liquides de digestion et en traitant ensuite par l'eau distillée, on a des cristaux de tyrosine avec A et B, non avec C, D et F.

Présure. — 1 c. c. de A, à 35°5, coagule 2 c. c. de lait chloroformé en moins de 10 minutes et 0,15 c. c. coagule la même quantité de lait en 25 minutes. 1 c. c. de B coagule 2 c. c. de lait en 35 minutes, et 0,15 c. c. coagule en 2 h. 15. Tous les autres extraits, même à la dose de 1 c. c., n'agissent pas sur le lait.

Lipase. — Si, à 5 c. c. de monobutyrine à 1 0/0, on ajoute 1 c. c. de chacun des extraits, on constate que tous, sans exception, à 35°, dédoublent une certaine quantité de monobutyrine. Le nombre de gouttes d'une solution de soude demi décinormale nécessaires pour revenir à la réaction au point de départ était, au bout de 40 heures d'action :

Pour A, 21 gouttes ;
Pour B, 10 gouttes ;
Pour C, 5 gouttes ;
Pour D, 8 gouttes ;
Pour F, 4 gouttes.

Bien entendu, les mêmes extraits chauffés avaient perdu toute action lipasique.

Oxydases. — Portier, dans ses *Recherches sur les oxydases*[1], s'est déjà occupé de la localisation de ces diastases chez les actinies. Il conclut à leur présence, principalement dans le mucus sécrété par les tentacules, mais le détail de ses expé-

1. Portier, *Thèse pour le doctorat en médecine*, Paris, 1897.

riences montre que l'action qu'il a observée sur la teinture de gaïac n'a jamais été bien nette.

Comme lui, j'ai versé de la teinture alcoolique de gaïac sur les diverses régions d'une actinie (*Adamsia Rondeletti* = *Sagartia parasitica*) sans obtenir de bleuissement appréciable. Seuls, les aconties qui sont, comme on le sait, d'un blanc de lait, se sont teintés légèrement de bleu à la périphérie.

J'ai en plus essayé l'action de divers extraits sur l'émulsion de teinture de gaïac dans l'eau. L'extrait d'aconties seul a amené un bleuissement assez net de l'émulsion de gaïac.

Les autres extraits et aussi le mucus n'ont pas déterminé un bleuissement plus intense que celui de tubes témoins. L'extrait d'organes génitaux et de filaments mésentériques n'a même pas donné la légère teinte bleue du gaïac à la lumière.

*
* *

En résumé, ces recherches mettent nettement en évidence la localisation presque exclusive des diastases digestives dans les filaments mésentériques, ce qui est tout à fait en rapport avec leur rôle capital dans la digestion des proies chez les Actinies. — Il était naturel de trouver une quantité encore appréciable de diastases dans l'extrait des régions génitales; elles sont en effet tapissées de cellules digestives. L'action présurante et protéolytique de l'extrait tentaculaire s'est montrée faible ou nulle; il est probable que, si j'avais expérimenté avec les tentacules très développés d'*Anemonia sulcata*, dont j'ai démontré le rôle dans la digestion des hématies, j'aurais obtenu un résultat meilleur.

Enfin, tous mes extraits ont dédoublé plus ou moins bien la monobutyrine; il en a été ainsi en particulier de l'extrait du tégument qui, il est vrai de le dire, s'est montré le moins lipasique.

VII

DIASTASES D'ACTINIES SOUMISES A UN RÉGIME ALIMENTAIRE

Si jusqu'ici on n'est arrivé à aucune modification du suc gastrique de chiens soumis à un régime alimentaire, on a obtenu des résultats très nets du côté de la sécrétion pancréatique. Ce suc acquiert une action beaucoup plus énergique *in vitro* sur les matières que les animaux sont habitués à digérer. D'autre part,

les leucocytes des animaux supérieurs qui, comme les cellules digestives des actinies, sont des réservoirs de diastases abandonnées difficilement dans le liquide circulant, mais qu'on retrouve dans les sérums, acquièrent facilement des propriétés lysinantes spécifiques vis-à-vis des éléments divers introduits dans l'organisme par voie d'inoculation[1]; c'est la question des cytotoxines expérimentales, résolue par les nombreux travaux de ces dernières années.

Je me suis posé la même question avec les actinies, et malgré les nombreux essais tentés pendant deux longs séjours au bord de la mer, et en me plaçant dans les meilleures conditions expérimentales, je suis arrivé à un résultat absolument négatif.

Les actinies en expérience étaient laissées dans leur milieu naturel. J'étais sûr de les retrouver toujours au même endroit. En 1899, j'ai opéré uniquement avec du caillot de poule. En 1900, j'ai varié les conditions expérimentales. Ayant remarqué que la fibrine et surtout le caillot de mouton sont difficilement dissous par l'actinodiastase, alors que le caillot de poule l'est assez facilement, j'ai nourri 3 lots différents d'*Anemonia sulcata*, le premier avec de la fibrine de mouton, le second avec du caillot du même animal, le 3e avec du caillot de poule; un 4e lot recevait des organes pédieux d'escargot, également très difficiles à digérer par l'actinodiastase. Chaque lot d'actinies recevait sa nourriture, toujours la même, en moyenne une fois par semaine; et chaque animal était nourri à satiété. Malgré cette pléthore de nourriture, les actinies refusaient rarement la proie que je leur offrais et paraissaient presque toutes en bonne santé. Quelques-unes cependant étaient flasques et, si elles étaient nourries avec du caillot, finissaient par perdre la coloration brune de leurs tentacules. Comme dans le cas des actinies injectées de bleu de méthylène, les algues symbiotes abandonnaient les tentacules, chassées sans doute par le pigment vert qui remplissait peu à peu les cellules endodermiques des tentacules et formait écran.

Chez les actinies nourries avec du caillot de poule, j'ai observé une certaine mortalité. Vers la 4e ou 5e nourriture,

1. Les recherches toutes récentes de Metchnikoff (*Centr. f. Bakt., Abth. I*, avril 1901), prouvent qu'on peut atteindre le même résultat en introduisant ces éléments (caillots divers) par voie buccale.

quelques-unes étaient tout à fait flasques, ne réagissaient pas au contact avec un corps étranger, refusaient tout aliment; les jours suivants, elles avaient disparu, sans doute mortes et balayées par le flot. Ce caillot de mouton, à doses répétées, montre donc une certaine toxicité pour les actinies. Mais, je le répète, ces accidents ont été rares, et la grande majorité des actinies en expérience ont parfaitement supporté les régimes alimentaires auxquels je les soumettais.

Après un certain nombre de nourritures (jusqu'à 7 pour le caillot de mouton), des actinies de chaque lot étaient emportées au laboratoire, en même temps que des actinies non soumises à un régime; des extraits étaient préparés par une des méthodes indiquées et essayés sur les diverses substances des régimes. Le temps écoulé entre la dernière nourriture et la mort de l'actinie a varié entre 6 et 16 jours. *Jamais* l'extrait d'une actinie nourrie avec un certain aliment ne s'est montré plus actif vis-à-vis de cet aliment que l'extrait d'actinies nourries avec un autre aliment, ou non soumises à un régime. J'ai fait à cet égard de très nombreuses expériences, dont il est inutile de donner ici le détail, et j'ai toujours eu le même résultat négatif.

Par conséquent, *les diastases des actinies soumises à un régime alimentaire n'acquièrent aucune propriété spécifique.*

Le liquide de la cavité gastro-vasculaire de ces mêmes actinies s'est montré tout à fait dépourvu de propriétés diastasiques; il n'a pas non plus acquis de propriétés fixatrices pour les aliments composant le régime, à la façon des substances sensibilisatrices spécifiques que l'on peut développer en grande quantité dans les sérums des animaux supérieurs soumis à des injections appropriées, et auxquelles les cytotoxines doivent leurs propriétés dissolvantes spécifiques si intenses.

L'extrait de filaments mésentériques paraît d'ailleurs dénué de toute substance sensibilisatrice. Chauffé à 58°, il a, comme je l'ai montré, perdu tout ou presque tout (suivant le cas) son pouvoir protéolytique; mélangé avec un peu d'actinodiastase fraîche, il ne récupère rien. La petite quantité de protéase ajoutée agit comme si elle était seule.

C'est peut-être à l'absence chez les actinies de substances analogues aux sensibilisatrices des animaux supérieurs qu'il faut attribuer la non modification des extraits diastasiques d'actinies

soumises longtemps à un régime. Dans les cas où, chez les mammifères et les oiseaux, on a obtenu des résultats dans la voie où je me suis engagé chez les actinies, il y a probablement sensibilisatrice préformée, quoiqu'en faible quantité (par exemple l'*entérokynase* du suc intestinal).

J'ai montré, dans un chapitre précédent, que la faible digestion du caillot et de la fibrine de mouton dans l'actinodiastase tient à la présence d'antidiastases abondantes dans le sang du mouton. Il était donc indiqué de rechercher si, chez les actinies soumises au régime du caillot ou de la fibrine de mouton, il ne se développe pas quelque substance capable de neutraliser l'antidiastase du sang de mouton. Mes essais pour mettre en évidence une substance semblable dans les extraits diastasiques ont encore été infructueux : le sérum de mouton se montre aussi empêchant vis-à-vis des diastases d'actinies nourries avec des dérivés du sang de mouton qu'avec toute autre diastase.

En résumé, malgré les bonnes conditions expérimentales dans lesquelles je me suis placé, il m'a été impossible de faire fabriquer aux actinies d'autres ferments solubles que ceux qu'ils produisent naturellement, ni même ceux-ci en quantité plus considérable. Ce résultat cadre, d'une façon générale, avec ceux que nous devons à Metchnikoff qui, dans ses études de pathologie comparée, a montré que les propriétés des humeurs contre les microbes ou leurs toxines n'apparaissent que chez les animaux très élevés en organisation; par exemple, les antitoxines ne sont formées que chez les vertébrés à sang chaud, ou chez les crocodiliens placés à 35°.

VIII

CONCLUSIONS

Brièvement, on peut dire que l'acte digestif des actinies ne s'accomplit que dans la cellule même qui produit la diastase. J'ai montré que le liquide de la cavité cœlentérique est dénué de toute propriété diastasique, c'est-à-dire digestive. En opérant avec un aliment facile à observer au microscope, le globule rouge, j'ai suivi toutes les transformations de cette substance depuis son incorporation par la cellule digestive, alors qu'elle

n'a subi aucune modification dans la cavité cœlentérique, jusqu'à sa disparition complète.

Toutes les diastases qu'on peut retirer des cellules digestives des actinies, en détruisant ces cellules, et dont on peut ainsi observer l'action *in vitro*, ressemblent beaucoup, par leurs conditions d'action, par les substances sur lesquelles elles peuvent agir, à celles que l'on connaît chez les animaux à digestion extracellulaire et en particulier chez les mammifères. Par conséquent, d'un bout à l'autre de l'échelle animale, les processus digestifs sont identiques dans leur essence. La digestion intracellullaire, au point de vue physiologique, ne diffère en rien de la digestion extracellulaire. Dans les deux cas, ce sont des *variétés* diverses des mêmes *espèces* de diastases qui agissent : voir par exemple les différences entre l'actinoprotéase et la trypsine du suc pancréatique des mammifères, l'actinoprésure et le lab des mammifères. Ces diastases sont soumises aux mêmes lois ; j'ai insisté, en ce qui concerne l'actinodiastase sur l'influence de la température, de la réaction du milieu, sur l'action empêchante des sérums des animaux supérieurs.

Une autre comparaison s'impose entre l'actinodiastase et les produits leucocytaires. *Physiologiquement*, les uns et les autres agissent à l'intérieur même de la cellule qui les produit. Ils sont régis par les mêmes lois. Ainsi, l'hémolysine de l'actinodiastase est détruite à 56° comme celle des sérums; au contraire, la lipase des uns et des autres résiste à des températures plus élevées. Dans le mode d'action, il y a encore des analogies : la façon dont l'actinodiastase agit sur les hématies rappelle beaucoup ce que l'on a observé dans la destruction des globules rouges par les hémotoxines ; et la mise en sphère des hématies par l'actinodiastase n'est pas sans analogie avec le phénomène de Pfeiffer.

On se convainc de plus en plus de la multiplicité des diastases que peut sécréter le globule blanc des animaux supérieurs. Or, si l'on jette un regard sur la liste des diastases digestives qui existent dans le pus [1], on est frappé des analogies avec la liste des enzymes contenues dans l'actinodiastase; par exemple, pour ce qui regarde les substances hydrocarbonées, il y a de l'amylase dans l'actinodiastase et dans le pus ; la sucrase manque dans ces deux liquides. Il y a une grande ressemblance entre la pro-

1. Achalme, *Comptes rendus Soc. Biologie*, 1899, p. 568.

téase qui produit l'autodigestion de la fibrine et l'actinoprotéase.

En un mot, la notion de l'universalité des ferments solubles de nature diastasique chez toutes les cellules vivantes s'impose de plus en plus.

La cellule digestive des actinies représente donc, à l'état indifférencié, embryonnaire si l'on veut, ce qui, chez les êtres supérieurs, constitue deux systèmes bien distincts, à fonctions séparées, le système sanguin et le système digestif. Grâce à la concentration des cellules digestives sur tout le pourtour méandriforme de la cavité cœlentérique des actinies, grâce aux propriétés pseudopodiques et plasmodiales de ces cellules, on assiste à ce fait, paradoxal *a priori*, de la digestion complètement intracellulaire d'une proie telle qu'un poisson ou un crabe, englobée vivante et intacte. L'actinie constitue incontestablement le type animal le plus hautement différencié parmi ceux qui ont conservé le mode, certainement primordial chez les êtres vivants, de la digestion intracellulaire.

ESSAIS SUR LA NATURE CHIMIQUE DES TISSUS

PAR A. ÉTARD

PREMIER MÉMOIRE

I

EXPOSÉ

Les toxines et les antitoxines ont pris une place capitale dans la médecine. Ainsi est apparu en chimie un nouveau problème : celui de connaître un jour la constitution de ces toxines et de savoir si ces matières actives sont des albuminoïdes. Dix grammes de sérum antidiphtérique, par exemple, peuvent avoir une action thérapeutique spécifique ; il n'y a là qu'un gramme de substances pouvant être utiles, car le reste est de l'eau. Ce gramme est-il formé lui-même d'un albuminoïde indifférent additionné de quelques millièmes d'une matière active qui, inséparable quant à présent, pourrait cependant n'avoir rien de commun avec une albumine, ou bien le gramme d'albumine du sérum considéré est-il une modification active dans toute sa masse, et capable d'action thérapeutique parce qu'il serait une albumine isomère douée d'action physiologique?

Quoi qu'il en soit de cette question, les toxines sont, quant à présent, inséparables des albuminoïdes, toutes ces matières dérivant de la cellule neuve ou modifiée. Ces albuminoïdes agissent régulièrement comme aliments ; par exception comme poisons ou toxines quand elles sont injectées. Il y a toujours là une étude d'albuminoïdes à faire.

Dans tous les cas le protoplasma, si différencié et particulier qu'il puisse être, se trouve représenté par un albuminoïde qui, en moyenne, d'après l'expérience, contient toujours 16 0/0 d'azote. Ce fait montre que les albuminoïdes, toujours dérivés de la vie protoplasmique, devraient recevoir le nom de *proto-*

plasmides, afin d'écarter l'idée restreinte d'albumen d'œuf, d'albumine de blanc d'œuf, et d'étendre la notion des saccharides plus ou moins condensés aux protoplasmides ou albuminoïdes en général.

Ces protoplasmides sont probablement très nombreux. Rien ne nous assure même que, pris dans les tissus qui exercent la même fonction, ils soient toujours identiques, que le protoplasme musculaire ou nerveux ait toujours la même composition dans toute la série animale ou même chez tous les mammifères. Comme il est pourtant le substratum de la vie cellulaire, qu'il y soit actif ou passif, qu'il puisse se transformer lui-même en toxine, ou subir l'action d'une toxine sécrétée dans sa masse ou venue de l'extérieur, il y a lieu de pousser l'étude des protoplasmides aussi loin pour le moins que celle des saccharides.

Cela demandera du temps, car les protoplasmides sont des composés quaternaires bien plus complexes que les saccharides ternaires, qui n'ont pas exigé moins d'un demi-siècle d'efforts avant d'entrer dans la voie d'une étude rationnelle.

En vue du but à atteindre, il faut à chaque moment se faire une idée directrice, au risque de la voir démontrer fausse ou de la modifier soi-même plus tard. Dans cet ordre d'études, je considérerai les protoplasmides comme des saccharides amidés susceptibles de se transformer par hydrolyse simple. Ce n'est pas là une vague conjecture; je possède déjà des composés barytiques bien plus oxygénés que les acides amidés et dérivés des tissus animaux.

Pendant longtemps, l'acide pectique, la vasculose, les mucilages, les gommes, les matières incrustantes des bois, le glycogène, le lactose, etc., ont semblé être tous des corps définis comme espèce et aussi variés que difficiles à identifier. On sait maintenant que ce sont des agrégats plus ou moins condensés de diverses hexoses, pentoses, etc., bien caractérisés. Avec plus de complexité, les protoplasmides en sont encore à l'ancienne étape des polysaccharides, au temps où l'on n'osait pas developper la formule du glucose avec cinq fois (OH), et moins encore songer à distribuer ces (OH) avec une symétrie droite ou gauche.

II

MÉTHODE DE TRAVAIL

Comme méthode primitive de travail, on peut appliquer l'hydrolyse sulfurique de Proust, puis de Braconnot (1821), l'hydrolyse barytique de Schützemberger (1880), ou l'hydrolyse compliquée de réduction par l'acide chlorhydrique et l'étain, surtout appliquée récemment par Kossel.

La méthode appliquée avec tant de succès par Kossel conduit à des réductions avancées et à une fragmentation trop grande de molécules excessivement compliquées. Cela efface trop complètement les grandes relations primitives qu'il est nécessaire de connaître pour une première étude d'ensemble.

L'hydrolyse par la baryte suturée à 200° amène aussi des dislocations trop profondes. Elle équivaut parfois à une véritable combustion de substances délicates qui se trouvent ramenées aux états minéraux simples de CO^2, AzH^3 et aussi de $C^2O^4H^2$...

L'hydrolyse par l'acide sulfurique à 20 0/0 provoque la dissolution des protoplasmides vers 111° sans réactions secondaires observables. C'est la méthode simple que je me propose de suivre dans ces études.

Les résultats actuellement connus de l'hydrolyse sulfurique se bornent à peu de faits et beaucoup de développements.

Braconnot (1821), attaquant la colle forte provenant d'os, tendons, etc., a obtenu une matière cristallisée, croquante, très sucrée, qu'il nomma glycocolle. Il n'en pouvait faire l'analyse en ce temps; elle a été identifiée depuis en toute certitude avec l'acide amido-acétique. En même temps, Braconnot retrouvait la leucine de Proust, identifiée avec un des acides amido-caproïques prévus. Bien qu'on dise toujours la « leucine », il y a lieu en effet de se demander si toutes les leucines d'origine biolologique sont identiques, ce qui est possible. D'après Neumeister, dans son traité récent, la « leucine » serait :

$$\begin{matrix} CH^3 \\ CH^3 \end{matrix} > CH^2 - CH^2 - CH(AzH^2) - CO^2H$$

I. *Expériences sur le tissu osseux.* — Les os décalcifiés des fabriques de cette colle forte, connus sous le nom de caboches (têtes de ruminants), ont servi à de premières études. Ils con-

tiennent encore des sels et de l'humidité. Vingt kilogrammes de ces os décalcifiés ont été portés à l'ébullition avec trente kilogrammes d'acide sulfurique à 40 0/0 et maintenu tel. Les os se dissolvent en moins de 48 heures, sans donner lieu à aucun phénomène apparent. Les liquides sont assez noirs si la dissolution par hydrolyse se fait à l'air, et à peine colorés quand on opère au *refrigérant ascendant* dans des ballons de 10 litres au plus. Les produits de l'attaque doivent être séparés des graisses solidifiées : ces dernières sont lavées, puis fondues, et les eaux jointes à la masse organo-sulfurique totale. Il s'agit après cela de faire disparaître l'acide sulfurique ayant servi à l'hydrolyse. Le carbonate de baryum précipité, *non desséché*, ou l'hydrate de baryum paraissent les mieux appropriés à ce but, malgré leur prix élevé, mais ce procédé donne des liqueurs incommodes à filtrer. Les acides organo-sulfuriques étendus d'eau ont été placés dans un bac en bois et saturés par un lait de carbonate de calcium (blanc de Meudon) jusqu'à la cessation de toute effervescence. On peut alors passer le mélange au filtre-presse et recommencer une seconde fois, après avoir délayé dans l'eau les gâteaux calciques qui deviennent désormais bons à jeter, si l'on ne tient à une recherche spéciale de matières insolubles fort peu abondantes.

Les eaux sortant du filtre-presse contiennent beaucoup de sulfate calcique en dissolution ; elles ont été évaporées au bain-marie et ont donné pendant quelque temps des dépôts successifs, assez plâtré, susceptibles d'être filtrés à la trompe.

Dans ces dépôts, qui ont été réunis, se trouvent, entre autre choses, le glycocolle et la leucine des os. Après quelques jours de travail, les dépôts cessent, la matière devenue visqueuse prend une tension de vapeur constante sur bain-marie. Il convient alors de la conserver dans des vases bouchés. Après quelques semaines, elle prend l'aspect d'un miel roux semé de petits cristaux de glycocolle et un peu fluorescent. A la suite de ce traitement, on se trouve donc en présence de deux catégories de matières : les unes cristallisables, fort peu abondantes : les autres, incristallisables, constituant de beaucoup, pour les os, la masse principale.

L'étude des matériaux cristallins a été abordée la première. On les redissout dans très peu d'eau, puis on passe les cristaux

à la trompe; les eaux mères vont rejoindre la masse incristallisable. Les cristaux déjà purifiés de la sorte et desséchés contiennent assez de matières étrangères visqueuses pour redevenir poisseux dans les allonges d'épuisement à l'alcool méthylique. Même dans des cartouches en papier filtrant, on n'obtient pas toujours un résultat pratique, la fusion du magma le rendant imperméable à l'alcool qui circule simplement autour. Le mieux pour ce genre de recherches est de découper un grand nombre de petits rectangles de calicot lavé, d'y mettre environ 5 grammes de matières à épuiser, de lier les deux bouts et d'aplatir ces sortes de papillotes. Le lessivage à l'alcool ou à l'alcool méthylique bouillant se fait alors rapidement dans les allonges à reflux. Quand les alcools passent clairs, l'épuisement est terminé, les nouets aplatis contiennent une matière sèche cassante, dure, à peu près incolore, riche en sulfate de calcium et en glycocolle, peu soluble dans les alcools concentrés. Dans les liquides bruns d'épuisement se trouvent des sphérules microscopiques, formant une poudre cireuse ressemblant à du lycopode, et qui servira plus tard à l'étude de la leucine.

Divers essais préalables pour simplifier les traitements ou chercher des séparations relativement aisées m'ont empêché dans ces premiers travaux de prendre tous les poids.

Cependant je ne puis évaluer à plus de 500 grammes le glycocolle obtenu avec 20 kilos d'os décalcifiés, soit 2 1/2 pour cent. La leucine brute n'a pas atteint 100 grammes, soit 0.5 0/0.

La presque totalité de la matière n'a pas encore été étudiée suffisamment; elle correspond en partie à ce que Schützemberger a désigné sous les noms de glucoprotéïnes et de leucéïnes.

La formule de constitution des albuminoïdes de Schützemberger, si souvent transcrite dans les livres, était, au moment où elle parut, un excellent schéma de laboratoire, poussant à l'expérimentation. En ce temps, la cryoscopie et la réfraction n'étaient pas en usage, et même la signification des observations polarimétriques donnait lieu à controverse. Aussi l'auteur a-t-il évité avec toute sa conscience scientifique d'introduire dans une formule très générale les précisions qu'on y a mises depuis, et qui créent un préjugé, une idée faite, de nature à empêcher de nouveaux efforts. Avec une telle interprétation, on arrive à considérer les protoplasmides comme un minerai d'acides ami-

dés, notamment de glycocolle et de leucine qui, dans les os au moins, ne figurent que pour un chiffre minime après l'hydrolyse simple.

Je ne puis parler plus longuement de cette question sans reproduire le schéma général de Schützemberger, en abrégeant les détails au moyen d'un pointillé.

$$\begin{array}{l} CO - Az < \begin{array}{l} CO - C^{a}H^{2a} - AzH - C^{b}H^{2b} - AzH - C^{d}H^{2d} - CO - OH \\ CO - C^{a'}H^{2a'} - AzH - C^{b'}H^{2b'} - Az - C^{d'}H^{2d'} - CO \end{array} \\ \quad | \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad \underbrace{\qquad\qquad\qquad}_{} \\ (1) \quad CO - Az < \begin{array}{l} CO - CH^{3} \\ CO \end{array} \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad > C^{n}H^{2n-2} < \begin{array}{l} AzH \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ AzH \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \end{array} \\ CO < \begin{array}{l} Az - CO \\ Az < \begin{array}{l} CO \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ CO \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \end{array} \end{array} \end{array}$$

Le système est fait pour montrer que des acides amidés sont cimentés par des résidus d'acide oxalique, d'urée, de carbamide et des carbonyles. Le ciment en question a été disposé de façon à expliquer la présence expérimentalement constatée d'ammoniaque, ainsi que de carbonate et même d'oxalate de baryum lors du dédoublement par la baryte à 200.

Les expériences accumulées dès avant 1890 autorisent à dire que les groupes oxalique et uréïque mis en évidence dans le schéma ne sont pas indispensables pour expliquer les faits, car les alcalis à température élevée transforment les saccharides en oxalates (fabrication de l'acide oxalique) et les matières azotées les plus diverses rendent de l'ammoniaque. J'ai d'ailleurs refait à ce point de vue une expérience qui permit à Cahours d'établir la fonction amine du glycocolle. Cet acide amidé pur a été chauffé avec de l'eau de baryte limpide à 200°. Après 24 heures on a pu doser 1,27 0/0 de la matière en ammoniaque. Mais, en plus de l'ammoniaque, il s'est formé 4,6 0/0 de carbonate de baryum. La destruction prouvée quant au carbonate, les autres substances n'ont pas été cherchées.

Dans l'action des alcalis sur les protoplasmides, le glycocolle formé suffit à expliquer au moins l'ammoniaque et l'acide carbonique produit, sans compter l'acide oxalique probable ainsi que l'acide acétique. Une partie du glycocolle est consommé de la sorte. Pour le présent, tout schéma des protoplasmides semble prématuré.

II. *Glycocolle et leucine du tissu osseux.* — Il a été exposé plus

1. *Dictionnaire de Würtz*, 2e suppl., t. I, p. 130

haut que la concentration des liquides d'hydrolyse sulfurique des os saturés par la craie laisse déposer des cristaux empâtés de matières sirupeuses, et qu'il reste finalement un miel brun parsemé de cristallites de glycocolle. Un peu de ce miel est dissous dans une quantité insuffisante d'eau froide et passé à la trompe; les eaux qui filtrent servent de liquide de clairçage, et il reste sur les entonnoirs à grande surface du glycocolle impur.

Les premiers dépôts cristallins du traitement d'ensemble contiennent aussi du glycocolle, mélangé de plâtre, de très peu de tyrosine, et d'autres matières déliquescentes; mais le tout est insoluble dans l'alcool méthylique. Ce glycocolle se trouvera donc parmi les produits des nouets dont il a été parlé plus haut. Le glycocolle cristallisant très bien, comme on sait, peut être séparé par cristallisation fractionnée. On accumule ses cristaux durs. La purification réussit mal par le noir animal; le mieux est d'ajouter à la solution de l'acétate de plomb, puis de saturer d'hydrogène sulfuré. Le sulfure de plomb donne souvent des résultats excellents dans les travaux de ce genre en agissant comme noir animal.

Après quelques nouvelles cristallisations, on obtient de gros cristaux incolores parfaitement caractérisés. Le glycocolle est la matière la moins difficile à isoler de ces milieux, c'est lui qui s'est présenté le premier à la vue des observateurs, et je n'ai pas à décrire cet acide bien connu et sans isomères.

Glycocolle cuivrique. — Je ne connais pas encore de précipitation sûre permettant d'enlever en une fois le glycocolle des milieux où il se trouve en petite quantité. Voici cependant quelques faits observés. Une solution pure de cet acide amidé précipite par l'acétate de cuivre saturé, le précipité peut même être lavé sur trompe, puis redissous dans l'eau: sa solubilité à 15° est de 0,7 0/0, soit 7 grammes par litre.

Le glycocolate se dépose en longues aiguilles non dichroïques comme le sont les cristaux d'acétate cuprique au microscope. Malgré cette faible solubilité, on ne peut compter sur le sel de cuivre pour une séparation, car les impuretés des milieux empêchent toute précipitation.

Leucine. — De nombreux travaux contradictoires ayant paru

sur cette matière, je ne crois pas inutile de résumer les faits que j'ai soigneusement observés, qu'ils soient ou non d'accord avec les documents connus. Diverses apparences ont été attribuées à « la leucine ». En lamelles semblables à l'acide borique pour les uns, elle est en « boules » selon d'autres. La leucine du commerce que j'ai vue est grisâtre, en boules, et certainement impure.

De l'examen des formules de l'acide caproïque, on conclut qu'il y a 31 leucines possibles en isomérie plane. Il y a donc là toute une question à étudier, mais surtout il est nécessaire de définir la leucine dont on parle et d'écarter en principe ce mot simple : la leucine, Je ne me propose pas d'établir les positions atomiques dans une leucine, mais de décrire la leucine provenant des os de bœuf et, si cela se présentait, d'autres leucines biologiques.

Dans le traitement général dont j'ai parlé, on est amené à épuiser des matières cristalloïdes par l'alcool méthylique bouillant dans des sachets en calicot, le glycocolle, le plâtre et d'autres corps restent pratiquement non dissous. Quand l'alcool méthylique passe incolore, on arrête, et du jour au lendemain il se fait un précipité grenu dans ces alcools d'ailleurs très colorés. Ce précipité est de la leucine « en boules » fort impure. De l'ensemble de ces faits il résulte que, pendant la concentration des sirops aqueux primitifs, il se dépose, avec du plâtre, un peu de tyrosine, *toute la leucine* et enfin une partie du glycocolle, puis des matières très oxygénées restant incristallisables. Ce n'est pas seulement la tyrosine qui est peu soluble dans les eaux de concentration, mais encore la leucine des os ou de la colle, identique ou non avec toutes les leucines protoplasmiques. Cela reste à voir.

La leucine en boules est redissoute dans l'alcool méthylique bouillant, par lessivage au refrigérant ascendant. Cette matière est extrêmement peu soluble dans les alcools forts, on a ainsi l'avantage de la purifier des corps qui s'y dissolvent, parce qu'ils restent incristallisables dans les eaux mères. Par contre, la préparation qui consiste à dissoudre la leucine en boules dans de grandes masses d'alcool qu'on laisse évaporer spontanément est non seulement très onéreuse, mais nuisible. On entretient dans les eaux mères les impuretés solubles. De la sorte, la leucine en boules peut se décolorer un peu, mais non se purifier,

comme cela a lieu par cristallisation usuelle dans l'eau bouillante et refroidissement. Quand elle a cédé à l'alcool les impuretés solubles dans ce véhicule, la leucine d'os en boules est suffisamment propre pour cristalliser dans l'eau avec la plus grande facilité. Le glycocolle cristallisable et plus soluble, qui peut la salir, tend à s'accumuler dans les eaux mères et très vite on arrive à la leucine pure.

La leucine d'os cristallise de l'eau en très petites lamelles nacrées, agissant sur la lumière polarisée, mal définies et agglomérées entre elles. Elle reste sur l'eau froide comme de la poudre de lycopode, sa consistance est cireuse. L'eau bouillante la dissout abondamment, puis elle se dépose aussitôt par refroidissement. La solubilité à 15° est de 2, 8 0/0 ; une faible quantité d'impureté, notamment de glycocolle, la rendent très soluble. La conséquence de ces propriétés est de rendre difficile son examen cryoscopique. Le poids moléculaire obtenu dans ces conditions est 123.

Théorie : pour une leucine, 131 ; pour un acide amido-valérique, 117.

Afin de savoir si un échantillon de 25 grammes, considéré comme pur, était en réalité homogène, il a été divisé par cristallisation fractionnée en trois portions successives :

1ers Cristaux	$\alpha_D = -44'$	Solubilité.	2,83
2es Cristaux	$\alpha_D = -48'$	—	2,84
3es Cristaux	$\alpha_D = -40'$	—	3 »

Les eaux mères successives donnaient les mêmes nombres. Cette leucine est donc homogène et pure dans la limite des erreurs d'expérience.

Le pouvoir rotatoire gauche donné ci-dessus est très faible, en désaccord avec les valeurs publiées. Telle qu'elle est définie, cette leucine est peut-être en grande partie racémisée, et il n'y a pas lieu de donner à ce fait une importance spéciale. Il y aurait là un travail de dédoublement à tenter.

La leucine en boules, après deux dépôts dans l'alcool méthylique, est très blanche et se laisse écraser en lamelles.

Analyse :

C = 53.3 — 53.2
H = 9.4 — 9.2
Az = 11.0 — 10.7
Cendres 0.88

Cette substance, qui se sublime avec une grande rapidité sans toucher les parois des tubes, est peu aisée à brûler. En effet, la chaleur ne fond pas la leucine d'os : on ne peut donc lui fixer un point de fusion comme cela a été fait dans quelques ouvrages. Elle n'a pas de goût sucré notable, et se sublime sans laisser de résidu noir, à moins qu'elle ne contienne des traces de glycocolle. Un mélange équimoléculaire de leucine et de glycocolle, fait synthétiquement, devient très soluble, contrairement à ce qui a lieu pour chaque espèce séparée.

Évaporé lentement dans l'eau, il donne des cristaux différents des deux composants et paraissant être un glycocollate de leucine. Surchauffé, ce mélange laisse échapper bien peu de leucine, il se convertit en une matière charbonneuse dense, brillante. Dans ces faits se trouve la source de bien des confusions sur les principes cristalloïdes des protoplasmides : des cristaux obtenus pouvaient être des mélanges à propriétés mal interprétées. Le mélange synthétique, traité systématiquement par de l'alcool méthylique concentré, laisse déposer des aiguilles dures de glycocolle, la leucine dominant dans les liquides. Sur ce fait repose la séparation des deux dérivés amidés.

Au microscope, sur verre, la leucine donne des lamelles un peu nacrées, grasses, ou des boules hérissées, selon le dissolvant. Le glycocolle, dans le même cas, cristallise en beaux prismes nets comme du sulfate de sodium. Ces corps mélangés conduisent, selon les proportions, à des apparences diverses, mais toujours méconnaissables. L'identification des produits biologiques par le microscope me paraît actuellement des plus incertaines. Quelques grammes de matière première ne permettent que des séparations vagues à quelques exceptions près. Les préparations pures m'ont toujours donné des images homogènes. Les dessins que j'ai pu voir dans les livres montrent différents cristaux dans le même champ, dus aux impuretés ou au mode de cristallisation, aux prismes de glycocolle, etc...

Leucinate de cuivre. — A part sa formule et le fait de son existence, ce sel important est peu connu. Quand, dans une solution concentrée (3 0/0) de leucine pure (2 molécules), on verse une solution saturée d'acétate de cuivre (1 molécule), il se fait une liqueur d'un bleu très foncé. Il semble que le premier con-

tact donne lieu à une leucine-cupramine sur les groupes AzH^2. Presque aussitôt le liquide prend une teinte très pâle et il se précipite une poudre d'un violet lavande, comme si le cuivre avait formé un sel carboxylique. Ces cristaux grenus n'ont pas de forme remarquable, ils constituent cependant le plus sûr caractère de la leucine que je connaisse quant à présent par suite de leur insolubilité. Quand on les redissout à chaud, l'eau mère à 15° prise sur cristaux ne contient que 7 dix-millièmes de sel.

Analyse après dessiccation à 100°.

	Trouvé.	Théorie.
C.....	45.38	44.58
H.....	7.51	7.43
Cu.....	19.68	19.50

En solution étendue, le leucinate se précipite fort bien, mais pour une même solution l'action cesse à mesure qu'on ajoute des traces de glycocolle ou de liquides biologiques tels que l'urine.

Ce premier travail est un exposé avec une définition plus exacte de matières encore peu connues. J'espère pouvoir bientôt décrire de nouvelles substances de cet ordre.

BACTÉRIOLOGIE DE L'OZÈNE

DEUXIÈME MÉMOIRE

ÉTIOLOGIE ET PROPHILAXIE

PAR LE Dr FERNAND PEREZ (DE LA FACULTÉ DE PARIS)
Médecin de l'Hôpital des Enfants et de l'Hôpital Français de Buenos-Aires.

(Travail du laboratoire des éleveurs, dirigé par M. J. Lignières, d'Alfort).

Dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (décembre 1899), j'ai publié un mémoire sur la bactériologie de l'ozène, et décrit pour la première fois un microorganisme que je nommai *cocco-bacillus fœtidus ozenæ*, dont les principaux caractères sont les suivants :

Il est immobile, ne prend pas le Gram, ne liquéfie pas la gélatine, ne fait pas fermenter les solutions lactosées, ne coagule jamais le lait; il fait de l'indol et constitue un ferment puissant de l'urée. Il est pathogène pour le cobaye, la souris, le pigeon, le lapin. Presque toutes ses cultures sont fétides.

Avec ce microbe, remarquable par son affinité pour la muqueuse pituitaire, j'ai pu reproduire expérimentalement chez le lapin l'atrophie des cornets qui caractérise l'ozène vraie.

Lors de cette publication, je n'avais pratiqué que 63 examens bactériologiques des fosses nasales (rhinites diverses, 32; ozène, 22; fosses nasales normales, 9). Aujourd'hui, le nombre de mes examens bactériologiques dépasse 90, et je peux répéter ce que j'ai dit l'année dernière : « Dans l'espèce humaine, on rencontre notre *cocco-bacillus fœtidus ozenæ* seulement dans l'ozène. »

Ces différentes raisons m'avaient conduit à concevoir la rhinite atrophique fétide comme une affection microbienne, spécifique.

Certes, cette notion étiologique n'était pas nouvelle. Loewemberg en 1888 et Abel en 1893 avaient établi et défendu la nature parasitaire de l'ozène; ils avaient même parlé de

contagion. Mais étant donné l'absence de fétidité des cultures du *bacillus mucosus*, et l'impossibilité de reproduire avec lui l'atrophie, la grande majorité des rhinologistes semblait ne pas accepter les conclusions de ces auteurs.

Et de fait, aujourd'hui, on admet généralement que l'ozène est une rhinite constitutionnelle, héréditaire, dans laquelle les microbes jouent un rôle secondaire. Si bien que dans la pratique courante on ne fait jamais ni aux malades ni à leur entourage aucune indication relative à la possibilité de la contagion.

Inutile d'insister pour le moment sur les conséquences funestes d'une telle pratique.

La découverte du *cocco-bacillus fœtidus ozenæ* et, *comme nous allons le voir*, la probabilité de l'origine canine de cette maladie obligent à admettre sans réserves son étiologie parasitaire, sa contagiosité, et doivent faire rejeter définitivement les théories héréditaires et constitutionnelles.

Les déductions qui en découlent ont une réelle importance, car elles permettent d'établir sur des bases véritablement scientifiques la prophylaxie de l'ozène.

Dans le laboratoire des grands éleveurs argentins où je poursuivais mes recherches, mon maître. M. J. Lignières, continuait ses remarquables études sur les pasteurelloses [1] des différentes espèces animales.

Un jour il me dit avoir trouvé mon microbe de l'ozène dans un foyer pneumonique chez un chien rendu malade par inoculation intraveineuse d'une culture de pasteurella canine. Cette constatation fut expliquée tout d'abord par une contamination accidentelle du laboratoire. Elle nous surprit cependant quelque peu, étant données les précautions minutieuses prises dans la désinfection des cages et des différents objets de l'hôpital des animaux d'expérience. Quelque temps après, M. J. Lignières retrouva de nouveau le microbe de l'ozène dont je pus étudier tous les caractères; mais cette fois chez un chien atteint naturellement de pasteurellose canine, et apporté le jour même de sa mort au laboratoire. Il fallait donc écarter toute idée de contamination accidentelle. Nous étions en présence d'un fait nouveau, curieux, intéressant au plus haut point, qui imprimait une direction nouvelle à nos recherches.

1. Affection jadis décrite sous la désignation de septicémie hémorragique.

Je commençai alors à étudier la flore bactérienne du nez et de la salive des différentes espèces animales pour déterminer si l'existence de ce microbe était un fait spécial au chien ou commun à d'autres animaux.

Ces examens ont été pratiqués chez les chiens, les chats, les chevaux, l'âne, les porcs, les singes, les poules, la dinde, le canard, le bœuf, les moutons, les poissons et les crapauds.

Voici la technique suivie dans ces recherches :

Tout d'abord nous avons examiné directement sur lame la salive et le mucus nasal : coloration par la méthode de Gram-Nicolle; couleur de fond, safranine.

Puis, avec une spatule de platine stérilisée, nous cueillions le mucus nasal et la salive, qui servait ensuite à ensemencer différents tubes de bouillon-peptone et de gélose.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, nous avons examiné encore une fois les cultures en bouillon, et finalement, après dilution, nous procédions à l'isolement des différentes espèces microbiennes par la méthode des plaques sur gélose à 37°.

Les colonies isolées, nous avons pratiqué avec un soin scrupuleux toutes les réactions culturales des différentes espèces.

Nous avons suivi la même technique que dans nos recherches antérieures sur la bactériologie de l'ozène, de sorte que les résultats obtenus sont parfaitement comparables.

Nous avons ainsi isolé une foule d'espèces parmi lesquelles nous citerons les suivantes :

Staphylococcus albus, aureus et *citreus, streptocoques, b. subtilis, mesentericus vulgatus, megaterium*, b. type diphtérie, un coccus ovoïde, un coccus lancéolé type pneumocoque, *b. fluorescens liquefaciens, b. fluorescens non liquefaciens*, coli-bacille, trois paracoli, *proteus, prodigiosus*, une levure rose, un cocco-bacille que nous ferons connaître sous le nom de cocco-bacille *Palermo*, le B. de Friedlander, des Pasteurella, un cocco-bacille spécial chez le chien, un autre chez le poisson, finalement le *cocco-bacillus fœtidus ozenæ*, une fois sur 6 chiens. Je n'en ai pas trouvé sur les espèces suivantes, chats, chevaux, porcs, moutons, bœufs, poules, crapauds et poissons, pour chacune desquelles j'ai examiné 5 individus.

Ce microbe normal de la salive et du mucus nasal des chiens

peut se multiplier quand le chien devient malade, et c'est peut-être pour cela que M. L. Lignières l'a rencontré deux fois dans le foyer hépatisé d'un chien atteint de pasteurellose.

Le chien malade est donc surtout dangereux et capable de transmettre l'ozène, comme le rat propage la peste.

Cette notion absolument nouvelle de l'origine canine de l'ozène, basée sur des recherches de laboratoire, devait recevoir la confirmation de la clinique.

Nous avons donc soumis les différents malades ozéneux dont nous avons pu disposer à une enquête minutieuse, pour déterminer aussi exactement que possible la voie de la contagion.

Nous avons examiné 41 malades, chiffre qui est peut-être insuffisant pour entraîner définitivement la conviction.

Des chiens, dira-t-on, il y en a partout! Nous avons été ou nous sommes tous plus ou moins en contact avec ces animaux, et cependant l'ozène est loin d'être une affection très fréquente.

Cependant, qu'on veuille bien lire avec soin ces observations. Quelques-unes nous semblent absolument concluantes.

Nous ferons aussi remarquer que l'ozène est une affection rare dans les classes élevées de la société, par contre elle est d'observation courante dans les cliniques hospitalières.

C'est qu'en effet, dans les classes riches, surtout dans notre pays, la cohabitation avec les chiens est tout à fait exceptionnelle. Dans les classes moyennes, et surtout dans les classes pauvres, le chien vit avec ses maîtres, et est moins le gardien de la maison qu'un objet d'amusement pour les enfants qui le caressent, l'embrassent et dorment même quelquefois avec lui.

OBSERVATIONS D'OZÈNE DONT L'ORIGINE CANINE EST TRÈS PROBABLE

1. — M. C. P., 22 ans, F., malade depuis l'enfance; père et deux frères sains, a toujours beaucoup aimé les chiens. Aucun de ses frères ne les aime.

2. — A. B., 10 ans, M. Père, mère et frère sains. Est le seul dans la famille qui aime les chiens.

3. — M. R., 7 ans, M. Père, mère, cinq frères et une sœur, tous sains; a une passion pour les chiens. Les autres enfants ne jouent jamais avec eux.

3. — C. Q., 32 ans, F., une sœur âgée de 30 ans, institutrice, déclare catégoriquement ne pas connaître dans sa famille d'autres personnes malades du nez. C. Q., quand elle était jeune, jouait souvent avec des chiens.

5. — E. D., institutrice, 18 ans. Malade seulement depuis l'âge de 12 ans, et c'est depuis cet âge qu'elle a des chiens. Ses parents n'ont jamais rien eu au nez.

6. — J. H., 4 ans, F. Père et mère sains; n'a été en contact qu'avec sa mère et un petit chien qu'on lui donnait souvent au lit pour l'amuser et la distraire.

7. — M. G., 14 ans, F. Malade seulement depuis l'âge de 12 ans, âge auquel elle a été confiée aux soins de son grand-père, chasseur de profession, dont elle caressait les chiens. Père, mère et 5 frères parfaitement sains.

8. — M. C. F., 27 ans, F. 5 frères et 4 sœurs qui, dit-elle, sont sains. Ses autres frères n'aiment pas les chiens. Elle adorait un petit lévrier avec lequel elle jouait très souvent.

9. — R., 21 ans, F. Père et 4 frères parfaitement sains. Elle aimait beaucoup les chiens et jouait constamment avec eux.

Dans neuf autres observations, l'origine canine m'a paru moins probable.

Mais les 9 premières confirment les conclusions tirées des recherches bactériologiques, à savoir que le chien est capable de transmettre l'ozène à l'homme.

Nous savons très bien que ces déductions cliniques s'imposent uniquement par un nombre considérable d'observations. Sur ce terrain, les causes d'erreurs sont nombreuses. Cependant, dans ces 9 observations, nous avons bien pris nos précautions pour les éliminer. Nous avons observé personnellement tous les parents qui ont bien voulu se prêter à l'examen, nous avons demandé des renseignements précis sur les domestiques, sur l'époque à laquelle la maladie avait débuté, sur l'époque à laquelle les malades avaient commencé à fréquenter l'école, sur les amis de pension, sur l'habitude qu'ont certaines personnes, les femmes surtout, de se moucher avec des mouchoirs prêtés; bref, nous avons essayé d'éliminer par tous les moyens possibles la contagion humaine, et c'est alors seulement que nous nous sommes décidé à présenter ces observations comme démonstratives de l'origine canine de l'ozène.

Nous ne connaissons pas encore exactement les conditions dans lesquelles peut se produire cette contagion de l'animal à l'homme. Le chien sain est-il dangereux? Ou bien faut-il que notre cocco-bacille, hôte normal du chien, soit au préalable rendu plus virulent par une atteinte de pasteurellose canine (maladie des chiens)?

Cette dernière hypothèse est la plus probable, car une attaque de pasteurellose permet la pullulation du *cocco-bacillus fœtidus ozenæ*.

OBSERVATIONS D'OZÈNE OU LA CONTAGION HUMAINE EST TRÈS PROBABLE (OZÈNE FAMILIALE)

1. — M. A., 9 ans, M. Il a une sœur atteinte d'ozène.

2. — M. C., 10 ans, malade depuis l'âge de 2 1/2 à 3 ans : une sœur âgée de 15 ans, atteinte d'ozène.

3. — M. R., 16 ans, F. Une sœur âgée de 21 ans, atteinte d'ozène.

4. — C. R., 48 ans, M. Sa mère avait l'ozène, il a un fils atteint d'ozène.

5. — M. N., 7 ans, F. La mère est atteinte d'ozène.

6. — Q. H., 13 ans, F. Une sœur âgée de 21 ans, que j'ai examinée, est atteinte d'ozène.

7. — R. M., 19 ans, F. J'examine la mère qui est atteinte d'ozène.

8. — A. M., 9 ans. F. Sœur aînée et mère toutes deux atteintes d'ozène.

9. — L. S., 35 ans, M. Une sœur plus âgée est atteinte aussi d'ozène.

10. — M. L., 5 ans, M. La mère est saine, un frère plus âgé est atteint d'ozène.

11. — D. C., 17 ans, F. J'examine la mère, atteinte d'ozène.

12. — D. A., 17 ans, F. Mère atteinte d'ozène, deux sœurs plus jeunes atteintes aussi d'ozène.

Ces observations démontrent que plusieurs membres d'une même famille peuvent être atteints d'ozène. C'est l'ozène familiale qui sert de base à la théorie héréditaire soutenue par Zaufal. L'état rudimentaire des cornets, accompagné de l'élargissement des fosses nasales qui se transmet souvent par l'hérédité, serait, pour cet auteur, la cause principale de l'ozène.

Nous savons aujourd'hui ce que valent ces théories héréditaires, surtout après les travaux de Nocard sur le rôle que joue l'hérédité dans la transmission de la tuberculose.

Il en est de même pour l'ozène : la contagion pure et simple fournit une explication facile de ces cas d'ozène familiale, sans avoir besoin de recourir aux causes abstraites.

Il ne s'agit pas ici de contagion subtile, comme dans la scarlatine ou l'influenza. Pour la voir se produire, il faut des conditions toutes spéciales, contact intime, prolongé, que la vie de famille réalise presque à elle seule.

On observe quelquefois dans une famille deux frères qui partagent le même lit être seuls atteints d'ozène, tandis que les autres sont sains.

Voici une observation intéressante à plus d'un titre qui est en contradiction flagrante avec la théorie héréditaire :

Il s'agit d'une dame âgée de 30 ans, mariée, atteinte d'ozène des mieux

caractérisées et mère de 8 enfants, 6 filles et 2 garçons. Ces enfants ainsi que le mari n'ont aucune maladie des fosses nasales.

Mme X... serait atteinte d'ozène depuis un an seulement. Toute la famille est parfaitement d'accord sur ce point.

Pas de chien dans la maison. Père et mère seraient absolument sains. Les domestiques ne présentent rien de particulier. Pressée par mes questions, Mme X... me dit avoir un jeune frère, âgé de 13 ans, qui serait malade du nez, et dont voici l'histoire :

Mme X... étant déjà mariée, son père, veuf depuis plusieurs années, vint à se remarier et eut un enfant. Mme X... se décida alors à quitter la maison paternelle, vint habiter Buenos-Aires, et ne vit plus ni son père ni son frère.

A l'âge de 12 ans, cet enfant fut envoyé dans un grand pensionnat de Buenos-Aires en qualité d'élève interne et confié aux soins de sa sœur Mme X..., qui allait le voir régulièrement tous les jeudis et les dimanches.

Mme X... se rappelle très bien s'être servi plusieurs fois des mouchoirs de son frère, qui étaient toujours couverts de croûtes verdâtres et de mucosités fétides.

Sur ma demande, elle me présente cet enfant : je diagnostique un cas d'ozène typique. C'est en somme un exemple évident de contagion.

Le docteur Carl Michel, de Cologne, reprenant les idées de Vieussens et Reininger, a soutenu, en 1876, que l'ozène était due principalement à une inflammation suppurative des sinus et surtout des sinus ethnoïdaux et sphénoïdaux.

C'est la théorie anatomo-pathologique que Grunwald, de Munich, Bresgen et d'autres ont acceptée, et qui semble aujourd'hui rallier beaucoup d'adhérents.

Que dans l'ozène, les sinus soient souvent atteints, on ne saurait le nier. Les progrès de la technique rhinologique réalisés par d'habiles opérateurs, Grunwald, Hajeck... permettent d'affirmer à coup sûr l'existence de ces sinusites latentes, de les améliorer, de les guérir même quelquefois par un traitement approprié.

Mais de ce qu'on fait disparaître les croûtes et les mucosités en traitant les sinusites, il ne faudrait pas en conclure que la lésion de la muqueuse, l'atrophie des cornets, soit fonction de cette suppuration sinusale.

Cette atrophie si spéciale à la maladie, les lésions histologiques de la muqueuse ne sauraient s'expliquer par l'action directe des croûtes. Elles sont la conséquence fatale d'une inflammation spécifique d'intensité variable au début, mais qui d'emblée a une marche chronique. Ces variations d'intensité

expliquent les différences qu'on observe dans les degrés de l'atrophie.

La cystite blennorragique existe souvent apparemment, presque sans trace d'uréthrite antérieure. Viendra-t-on soutenir que le gonoccoque a franchi cette portion de l'urèthre sans la léser, pour s'installer d'emblée sur la muqueuse vésicale?

L'infection gonoccocique commence au méat pour se propager quelquefois jusqu'aux reins.

Le même fait doit s'observer pour l'ozène; l'infection débute sur la pituitaire pour gagner très souvent les différentes cavités accessoires avec une fréquence inégale.

Ces sinusites peuvent être le résultat de l'infection spécifique, ou bien dépendre du développement de microbes secondaires, si abondants dans l'ozène.

Mieux que toute cette argumentation, la reproduction expérimentale de l'atrophie des cornets chez les lapins, après une phase suraiguë de rhinite, à la suite de l'inoculation intraveineuse de notre microbe, prouve l'inanité de ces vues pathogéniques. A cette liste d'observations d'ozène, nous devons en ajouter huit autres dont l'origine a été impossible à déterminer; nous obtenons ainsi un total de 41 cas cliniques.

Parasitisme et contagion, voilà donc les deux grands facteurs étiologiques de l'ozène, qui permettent d'établir aujourd'hui sa prophylaxie, et laissent entrevoir la possibilité de la guérir dans un avenir plus ou moins rapproché.

Nous savons que la contagion peut être d'origine canine ou humaine : de là deux indications primordiales : empêcher la cohabitation des chiens et des personnes, des enfants surtout; éviter le contact intime et prolongé entre un ozéneux et des personnes saines. Désinfection des mouchoirs et des différents objets de toilette ou de table qui pourraient être contaminés par les mucosités ozéniques. Désinfection des fosses nasales du malade par de grands lavages antiseptiques, après application des tampons de Gottstein, cautérisations énergiques de la muqueuse pituitaire avec les solutions argentiques; traitement des sinusites par les procédés si magistralement décrits par Hajeck.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE JUIN 1901 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Contribution à l'étude de la diarrhée des jeunes veaux.

PAR MM. LESAGE ET DELMER

(Travail du laboratoire de M. Roux et de la clinique de M. le professeur Moussu (d'Alfort*).

La diarrhée des jeunes veaux est connue depuis longtemps, et tous les observateurs ont été frappés par ses caractères de gravité.

A la suite des recherches de Obich [1], Roloff [2], Guttmann [3], Kotelmann [4], Perroncito [5], Bongatz [6], Dieckerhoff [7], Albert [8], Rost [9], Nikolwski [10], Jensen [11], les auteurs classiques admettent que :

1° La maladie est d'origine microbienne : l'épidémicité fréquente plaide en faveur de cet argument. Elle frappe certaines étables et en respecte d'autres;

2° Le microbe est éliminé par les déjections, souille la litière et contagionne les veaux sains.

Contrairement à l'opinion d'Albert, Nikolwski a montré que le lait de la mère ne possédait aucune propriété pathogène.

*Nous remercions M. le professeur Moussu des excellents conseils qu'il a bien voulu nous donner dans le cours de ces recherches et de la libéralité avec laquelle il a mis à notre disposition toutes les ressources de sa clinique.

1. OBICH, Weisse ruhr. *Wochensch. für Thierheilk*, 1865, p. 101.
2. ROLOFF, *Recueil de médecine vétérinaire*, 1876, p. 521.
3. GUTTMANN, *Arch. vet.* 1884, p. 863.
4. KOTELMANN, *Berlin. Arch.*, 1885.
5. PERRONCITO, *Il medico veterinario*, 1885, n° 17.
6. BONGATZ, *Berlin. Arch.* 1889, p. 399.
7. DIECKERHOFF, KALBERRUHRA, *Lehrbuch. der speciellen Pathologie*, tome II, livre I, 1891, p. 82.
8. ALBERT, *Wochensch. für Thierartz*, n° 11, 1891.
9. ROST, *Idem*, 1892, p. 7.
10. NIKOLWSKI, *Arch. f. Veterinark.*, 1892.
11. JENSEN, *Monatshefte für Thierheilk.*, t. IV, 1893, p. 97.

Contrairement aux recherches de Mörkebug, les observations de Jensen ont établi que l'infection intra-utérine n'existait pas.

Jensen est le premier auteur qui incrimine un microbe net, le *B. coli*. Bientôt Piana[1], Mazzanti et Vigezzi[2], Monti et Veratti[3], Piana et Galli-Valerio[4], Mazzanti[5] admettent l'opinion émise par Jensen. Le *B. coli* se trouve, *à la mort*, dans tous les viscères ; il est éliminé par les déjections. Le veau sain absorberait, avec le lait, cet agent virulent et serait ainsi contagionné.

Jensen a pu obtenir l'infection par l'ingestion du contenu intestinal, chez des veaux âgés de moins de 2 jours.

Le *B. coli* normal aurait ainsi acquis de la virulence.

Tel était l'état de la question, quand nous avons commencé nos recherches en 1899.

Notre premier soin a été d'essayer de reproduire la maladie par ingestion de matières fécales et de cultures pures du *B. coli* issu de ces déjections. Nous n'avons jamais rien obtenu. Déjà Guttmann n'avait pas été plus heureux.

D'autre part, nous avons été frappé de ce fait que les études avaient été faites après la mort. Or nous savions, par nos recherches déjà anciennes, que le *B. coli* envahit tous les organismes morts naturellement. Il y avait déjà là un point de doute sur la valeur *spécifique* du *B. coli*. Bien plus, les travaux énumérés plus haut attribuent au *B. coli* des caractères qui lui sont propres et d'autres qui ne lui appartiennent pas. Il nous a semblé qu'il y avait probablement, dans ces cultures, quelques microbes étrangers. Effectivement, en inoculant à un lapin du sang d'un veau à l'agonie, nous avons remarqué qu'il y existait un cocco-bacille bien net. Or la culture de ce sang donnait du *B. coli*. En inoculant à un lapin cette culture du *B. coli*, nous obtenions le cocco-bacille, que le *B. coli* masquait dans son développement.

Caractères du cocco-bacille. Il appartient au groupe que Lignières dénomme *Pasteurella* et dont voici les caractères généraux.

Immobile, il est polymorphe (microccoque, bactérie ovoïde à espace

1. Piana, La moria dei vitelli, l'*Allevatore*, 1895, p. 977.
2. Mazzanti et Vigezzi, *La Diarrea bianca dei vitelli*, Parme, 1895.
3. Monti et Veratti, *Giorn. di. med. veter.*, 1895, p. 281.
4. Piana et Galli-Valerio, *Annali di agricolt.*, n° 210, 1896, p. 224.
5. Mazzanti, Ancora sopra la diarrea bianca dei vitelli da latte, Broch. Parme, 1897.

clair, bacille court, formes d'évolution en poire, en larme batavique). Aérobie, il se cultive moins abondamment dans le vide. Il ne passe pas au filtre F.

Il se colore facilement par toutes les couleurs. Cependant il prend peu l'éosine. Le bleu de Roux ou de Kühne le colorent très bien. — Il se décolore par la méthode de Gram. — Culture sur gélatine : en 24 heures, couche peu épaisse, vernissée, adhérente, n'atteignant pas les bords du tube. — Pas de liquéfaction. — Sur gélose, en 24 heures, culture peu épaisse, vernissée, transparente, ambrée, n'atteignant pas les bords du tube. — Absence d'odeur nette. — Bouillon Martin ou peptonisé : en 24 heures à 38°, production de trouble et d'une odeur forte *sui generis*. En 3 à 4 jours, disparition de l'odeur et dépôt de la culture au fond du matras, le trouble persiste. — Réaction alcaline persistante. — L'adjonction de sérum du sang ou d'ascite ne modifie pas la culture. — Absence de production d'acide sur les gélatines au tournesol. — Aucune culture sur pomme de terre. — Pas de production d'indol dans les bouillons de pancréas. — Aucune action sur les sucres. — Le lait n'est pas modifié. — Conserve longtemps son action virulente (1 an) dans le sang conservé en pipettes fermées. — Sur gélose, la culture desséchée lentement conserve son activité 3 mois.

Production de septicémie, avec diarrhée, suivie de la mort du lapin en 24 heures à 48 heures. (Lésions générales des septicémies ; présence du cocco-bacille seul dans le sang et les viscères, rate normale.) — Pour éviter l'envahissement cadavérique, prendre le sang au moment de l'agonie. — Cobaye : l'inoculation sous la peau donne des résultats inconstants, quelquefois lents en 5 à 6 jours. — L'inoculation dans le péritoine donne des résultats constants : mort en 24 à 48 heures (lésions des septicémies ; dans le péritoine : beaucoup de liquide avec fausses membranes ; culture très abondante, peu de leucocytes : présence du cocco-bacille dans tous les viscères). — Septicémie expérimentale chez la souris en 24 à 48 heures : cocco-bacille dans tous les viscères.

I. Pendant la vie. — 1. *Etude du sang.* — Quelle que soit la date de la maladie, la coloration du sang, sur lame, ne nous a montré, en aucun cas, de forme microbienne.

Culture : si la diarrhée date de quelques jours, 3, 4, 5, 6 jours, on observe quelques colonies du cocco-bacille, le plus souvent en petit nombre, 2, 3, 4 pour un tube de gélose. (Observations v, vii, viii, ix, xii, xiii, xiv, xix, xx.) On ne trouve pas d'autres microbes si la prise du sang est faite proprement.

Si le veau est à l'agonie (obs. i, ii, iv, v, vi,) on peut obtenir en plus des cultures de *B. coli* ou de staphylocoques. Ceci n'a rien qui puisse étonner : c'est l'envahissement cadavérique normal qui commence.

Si la maladie est ancienne (10-15 jours, obs. vii, xxi), la

culture du sang est stérile : le cocco-bacille disparaît de la circulation et la période septique est terminée.

La persistance du microbe dans le sang est d'un pronostic *immédiat* sérieux, car l'animal est encore aux prises avec la septicémie. Cependant le cocco-bacille étant disparu, l'animal n'est pas guéri, car il peut être enlevé quelques jours ou quelques semaines plus tard par des complications pulmonaires. Nous étudierons plus loin ce dernier point.

Déjà la culture nous renseigne sur l'état septique du sang, mais l'inoculation sous-cutanée, au lapin, du sang dilué dans du bouillon permettra d'affirmer ou non cet état septique. Si le cocco-bacille est dans le sang, soit seul, soit uni à d'autres microbes, l'inoculation sera positive. Sinon, le lapin ne présentera aucun accident. S'il existe d'autres microbes avec le cocco bacille, ceux-ci resteront au point d'inoculation, et ce dernier passera seul dans le sang du lapin. L'inoculation du sang au cobaye, soit sous la peau, soit dans le péritoine, est moins fidèle. Dans toutes nos recherches (obs. I, II, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XIX, XX, XXI), nous avons fait usage de lapins gros et bien portants, ne présentant aucune trace de maladie du nez.

2. *Etude des matières fécales.* Examen sur lame (méthode de Gram). La flore intestinale se simplifie à mesure que la diarrhée augmente. Les microbes colorés par cette méthode disparaissent, pour laisser la place aux microbes décolorés. L'examen microscopique permet de déceler souvent la présence de cellules de desquamation et, quelquefois, de globules rouges. *Culture sur plaque*, dans la majorité des cas (obs. I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XX, XXI), on obtient seulement des colonies de *B. coli* qui envahit tout.

Cependant, à l'examen simple et sans coloration de ces colonies, on peut remarquer, à côté des bacilles mobiles coliens, des formes immobiles (cocco-bacilles ou larmes bataviques), qui sont du cadre de la pasteurellose. La culture colienne semble impure. Si l'on cherche à séparer les deux variétés microbiennes, on y arrive rarement et péniblement. Comme les colonies coliennes et cocco-bacillaires se ressemblent, il faudra les étudier sur le lait. Si en 24 heures à 37°, le lait n'est pas coagulé, ce sera le cocco-bacille ou l'un des microbes paracoli et typhique.

Dans quatre cas (obs. VIII, X, XI, XIX), nous avons été assez heureux pour isoler d'emblée, en notable quantité, le cocco-bacille. Mais devant cette difficulté d'isolement, le mieux est de recourir à l'inoculation sous-cutanée chez le lapin des matières fécales diluées.

Si le cocco-bacille existe, la septicémie sera positive (obs. I à XX); il passe seul dans le sang et les autres microbes restent au point d'inoculation.

Si, au moment même, on n'a pas d'animal, le mieux est de laisser les matières fécales se dessécher à l'air dans un tube stérilisé. Après un an de date, l'inoculation peut réussir. Le cocco-bacille est donc d'une grande vitalité et peut subir une dessiccation lente.

Dans les cas où l'isolement donne seulement des cultures, en apparence pures, de *B. coli*, si l'on inocule au lapin ces cultures, on obtient la septicémie cocco-bacillaire pure.

Grâce à l'inoculation, nous avons noté chez tous les veaux, sauf un, la présence de la pasteurella dans les matières fécales. Cette inoculation a toujours été faite sous la peau, car l'injection intra-veineuse donne souvent (6 fois sur 8) des résultats négatifs.

3° *Mucus nasal.* — A partir du 3e ou 4e jour de la maladie, le veau présente souvent du jetage. Examiné par la méthode de Gram, ce mucus présente divers microbes colorés (surtout le staphylocoque) et une notable quantité de cocco-bacilles décolorés, et recolorés par l'éosine.

La culture peut mettre en évidence la présence du cocco-bacille. L'inoculation au lapin l'affirmera.

4° *Arthrites.* — On sait combien sont fréquentes les arthrites dans les infections cocco-bacillaires. Pendant la vie, par la ponction aseptique, le liquide pourra montrer, par la culture, la présence du cocco-bacille. En tout cas, l'inoculation au lapin sera positive.

II. Après la mort. — Nous avons déjà noté qu'à l'agonie on pouvait observer un envahissement cadavérique précoce. Il en est de même à la mort. Aussi, le plus souvent, la culture du sang donne-t-elle du *B. coli*, du staphylocoque, qui masquent la culture de pasteurella et peuvent l'étouffer. En ce cas le mieux

est d'inoculer le sang pris à l'autopsie; le lapin se charge d'isoler le cocco-bacille.

L'étude des matières fécales donne les mêmes résultats que pendant la vie. Cependant, en étudiant l'intestin grêle, on note une desquamation abondante de la muqueuse.

La mise en culture du foie, du rein, de l'urine et de la rate ne donne que rarement la pasteurella pure.

L'étude du mucus trachéal est importante. L'examen sur lame (méthode de Gram) montre la présence du pneumocoque, du staphylocoque, du *B. coli*, et du cocco-bacille. L'isolement par la culture peut se faire, mais le mieux est de pratiquer l'inoculation au lapin. La pasteurella existe dans tout l'arbre bronchique. Nous n'avons pu étudier des cas de complications pulmonaires. Le poumon était normal dans toutes nos observations.

Dans un cas, nous avons étudié minutieusement l'ombilic. Au niveau de la cicatrice, pas d'abcès, mais on note une phlébite des veines ombilicales : la veine est grosse, tendue, remplie d'un caillot simple, fibrineux, sans suppuration. Nous avons étudié ce caillot, par tranches; à la porte d'entrée, la coloration permet de reconnaître quelques formes microbiennes colorées au Gram, qui disparaissent à 1 centimètre de profondeur. La culture permet de reconnaître quelques colonies staphylococciques, coliennes, et de nombreuses colonies pasteurelliques. Chaque tranche du caillot donne, en culture d'emblée, la culture du cocco-bacille à l'état de pureté. L'ombilic est la porte d'entrée de l'infection cocco-bacillaire : il y a là un foyer initial, phlébitique, où le microbe cultive, avant de pénétrer dans le sang (obs xx). Peut-être y a-t-il lymphangite concomitante.

Étude des filtrats. — Nous savons que le microbe, en culture, ne passe pas au filtre F. Cependant la diarrhée et le mucus nasal ou trachéal soumis à la filtration nous ont souvent donné des résultats positifs, *mais inconstants*. Le filtrat est clair, ne donne aucune culture; inoculé au lapin, 10 fois sur 21 il a provoqué la septicémie cocco-bacillaire positive. L'animal meurt en 4 à 5 jours. Nous nous sommes défié des causes d'erreur, tenant soit à la bougie, soit à l'animal.

Nous devons nous demander si, *dans l'organisme*, le cocco-bacille, à un certain moment de son évolution, ne présente pas la propriété de passer au filtre F.

En tout cas, les filtrats provenant de veaux malades depuis 2 à 3 jours ne nous ont rien donné. Au contraire, nous avons obtenu des résultats positifs avec des filtrats provenant de veaux atteints depuis quelques jours. Il nous est difficile d'assigner exactement le jour où les matières fécales et le mucus nasal contiennent le cocco-bacille passant au filtre. D'ailleurs, nous ne pouvons, aujourd'hui, qu'enregistrer ce fait intéressant.

Conclusion. — Le résultat de nos recherches est le suivant. Il existe pendant la vie et après la mort, dans le sang, la diarrhée, le mucus nasal, et l'arthrite, un cocco-bacille, une pasteurella. Au moment de l'agonie et de la mort, divers microbes d'envahissement cadavérique passent dans le sang et les organes, et viennent, par leurs propriétés de pullulation rapide, gêner la recherche de ce cocco-bacille. L'expérience permet de le découvrir cependant. — Le *B. coli* n'existe pas dans le sang, pendant la vie. — Quand il accompagne le cocco-bacille, ce dernier seul est *actif, septique*, comme le démontre l'expérimentation. Il ne pénètre pas dans le caillot de l'ombilic (phlébite simple). Il reste dans l'intestin et n'envahit le corps qu'à l'agonie.

Son inoculation sous-cutanée en cultures pures, débarrassées des coccus par des cultures sur pomme de terre), ne provoque chez le veau aucune lésion ou donne un abcès. — L'ingestion de bouillon ne donne aucun résultat. — Dans un cas nous avons pratiqué une injection intra-veineuse de 1 c. c. de bouillon de culture de 24 heures, sans autre résultat qu'un léger accès de fièvre et une diarrhée légère de deux jours. Nous allons voir, au contraire, dans le chapitre suivant, que le cocco-bacille peut reproduire la maladie.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE VEAU

1° *Ingestion buccale.* — Résultat négatif, malgré la dose énorme de culture (1/2 litre), malgré la répétition de l'ingestion. — Le microbe était très actif, puisque 1/10e de centimètre cube sous la peau tuait le lapin en 24 heures ;

2° *Inoculation sous-cutanée.* — A dose légère, la culture (gélose grattée ou bouillon) jeune ou ancienne ne donne aucun résultat, même thermique. — Il apparaît une très petite induration sous-

cutanée, qui disparaît à la longue. — A *forte dose* (10 c. c. de bouillon ou tout un tube de gélose), on obtient une réaction locale plus intense, un abcès.

Point d'élévation thermique. — Tout se réduit à une lésion locale, qui contient pendant de nombreux jours le cocco-bacille pur. — On est obligé d'ouvrir l'abcès qui ne se réabsorbe pas. Pendant cette expérience, le microbe ne passe pas dans le sang, fait démontré par la culture et l'expérimentation.

Cependant si on exalte le microbe après passage sur le lapin ou mieux sur le veau, on peut reproduire la maladie (obs. XXII), qui dure 6 jours (fièvre, amaigrissement, diarrhée, mort). — Si on prend un cocco-bacille *non exalté*, on peut reproduire la maladie en l'unissant au *B. coli* (obs. XXXIII). Cette expérience montre que le microbe ne donnant qu'une lésion locale, peut, au contact du *B. coli*, provoquer la maladie chez le veau. — Il est à remarquer que le cocco-bacille passe seul dans le sang. Le *B. coli* reste à l'abcès, porte d'entrée. — Il est probable que ce dernier microbe occupe les phagocytes et permet le passage, dans le sang, du cocco-bacille.

3° *Inoculation intra-veineuse.* — Le résultat est variable, suivant que l'entrée des cocco-bacilles dans le sang est massive et brutale, ou lente et progressive.

Injecté à doses massives dans les veines (1/2 à 2 c. c. de bouillon de culture de 24 heures), l'animal meurt en 10 heures à 5 jours. de septicémie à forme diarrhéique. On reproduit ainsi la maladie avec sa rapidité variable d'évolution, arthrite, diarrhée, etc. (obs. XXIV XXV).

4° Aucun de ces modes de pénétration n'est le mode naturel : l'entrée se fait par la voie ombilicale.

Albert, Mazzanti et Vigezzi avaient déjà dit que le germe pénétrait à la faveur de la plaie ombilicale. M. Nocard professe la même opinion. M. Moussu a pu reproduire expérimentalement la septicémie des veaux, en appliquant sur la plaie ombilicale un pansement imbibé d'une culture provenant de veaux atteints de la maladie.

Dans nos expériences (obs. XXVI, XXVII, XXVIII), nous reproduisons la diarrhée des veaux, en mettant sur la plaie ombilicale, à la naissance, un tampon imbibé de culture pure du cocco-bacille, soit en inoculant sous la peau de l'ombilic, à

l'entrée du cordon, quelques gouttes de cette même culture. — L'animal est bientôt atteint de la maladie et meurt en 2 à 5 jours, après avoir présenté tout le cortège symptomatique.

Le microbe cultive dans le caillot et passe ensuite dans le sang et les viscères. — Il existe une première période de phlébite, dont la durée est variable suivant l'état du caillot. Courte, si le caillot est ramolli et suppuré, longue, au contraire, si le caillot est solide, fibrineux, résistant. La clinique nous montre ces variétés de lésions et d'évolution. — De plus, on note l'existence, dans les cas rapides, d'hémorrhagies du cordon, qui facilitent le passage du microbe dans le sang.

Nous avons pu reproduire cette phlébite, à la veine saphène (obs. XXVIII). — Un tronçon veineux est fermé aux deux extrémités. On y injecte une goutte de bouillon de culture. Le lendemain, quand le caillot est formé, on enlève la ligature la plus centrale. Le caillot s'étend vers la racine du membre. Le microbe s'y cultive, passe lentement, dans le sang. Peu à peu l'animal devient malade, et la maladie évolue lentement en 9 jours. A l'autopsie, l'étude du caillot par la culture et l'expérimentation montre que le cocco-bacille s'y est développé en un véritable foyer.

5° *Porte d'entrée nasale.* — La pénétration par l'ombilic ne permet pas d'expliquer l'apparition de la maladie chez des veaux âgés, sains jusqu'alors (obs. XXVIII). Dans une étable où des veaux nouveau-nés présentaient la maladie, un animal de 8 mois fut contagionné. Le cocco-bacille était dans l'intestin. Comme le microbe existe dans le jetage, il y a lieu de se demander si la contagion ne peut s'effectuer de museau à museau?

A ce sujet, l'expérimentation sur le lapin est instructive. Il suffit d'injecter dans les fosses nasales une culture du microbe. L'animal meurt, enlevé en 24-48 heures par la septicémie cocco-bacillaire. En ce cas, tout l'arbre broncho-pulmonaire contient une culture pure de microbe.

Étude comparative de la diarrhée des veaux et de la « white scour » d'Irlande. — Nous terminions ces recherches poursuivies à Alfort depuis deux ans, quand notre éminent maître, M. le professeur Nocard, fut appelé, en avril dernier, à étudier en Irlande une épidémie de « white scour » ou diarrhée blanche,

qui décimait les étables. Les veaux mouraient en 2 à 3 jours, de septicémie à forme diarrhéique.

A l'autopsie, M. Nocard trouva une flore nombreuse, dépourvue d'intérêt (*B. coli*, staphylocoque, etc.). Cependant, dans un cas, il put isoler, dans un foyer d'arthrite, un cocco-bacille, genre pasteurella, qu'il isola. Il retrouva ensuite ce microbe, chez d'autres veaux malades, dans le sang, les viscères et l'ombilic qui était le siège d'une phlébite. — Par injection intraveineuse, il reproduisit la septicémie avec tous ses caractères.

Dès son retour à Alfort, nous comparâmes la culture de ce microbe avec les nôtres. A un premier examen, à l'œil nu, les cultures semblaient différentes. Nous avons alors retardé la publication de nos recherches pour faire une étude comparative de ces deux cocco-bacilles. La différence d'aspect tient à ce que les cultures obtenues avec la diarrhée lente des veaux sont plus isolées et plus discrètes que les cultures obtenues avec la « white scour ». Ceci tient à la différence de virulence et d'activité. En effet, nous avons fait plusieurs passages par le veau avec notre microbe, et nous avons obtenu des cultures absolument identiques à celles de M. Nocard, et cela à tous les points de vue.

M. Nocard a bien voulu nous remettre une épreuve de sa communication à la Société centrale de médecine vétérinaire (25 avril 1901). Nous y trouvons relatés des faits qui indiquent le caractère très septique de la maladie, comparée à la diarrhée des veaux observée en France (durée courte, gravité des symptômes, envahissement intensif des organes par la flore normale de l'intestin et des bronches, phlébite suppurée de l'ombilic accompagnée d'hémorragies de la paroi.

Après avoir étudié les deux microbes, nous concluons à leur identité absolue.

Atténuation du cocco-bacille. — Partant d'une pasteurella des veaux active et virulente, on peut l'atténuer par la chaleur. On doit prendre, comme animal d'expérience, le lapin, car la sensibilité du cobaye, pour le microbe vivant, est des plus variables (inoculation sous-cutanée).

1) Chauffage 1 heure à 60°. — On obtient par la culture quelques colonies discrètes. *a*) On inocule 1/4 de c. c. sous la peau du lapin; l'animal meurt de septicémie cocco-bacillaire, comme si la culture n'avait pas été chauffée; *b*) Cette dose, ino-

culée dans le péritoine du cobaye, ne donne aucun résultat. 1 c. c. est nécessaire pour tuer l'animal, et encore en 6 ou 7 jours. Le cobaye est donc moins sensible au microbe que le lapin. Le cobaye meurt de septicémie cocco-bacillaire. L'étude du péritoine est intéressante, car elle nous montre une abondance de leucocytes que nous ne trouvons pas chez le cobaye inoculé avec la pasteurella non chauffée;

2) Chauffage 1 heure à 70°. — On n'obtient aucune culture. 1/4 de c. c. sous la peau du lapin ne tue plus l'animal, mais si on répète cette dose 3 et 4 fois à 3 jours d'intervalle, l'animal meurt en 7 à 8 jours après la dernière injection. Même fait, si on injecte d'emblée 2 c. c. en une seule fois. Le lapin meurt de septicémie pasteurellique. Donc un séjour d'une heure à 70° ne tue pas le microbe, mais l'atténue.

Cette septicémie lente (7 à 8 jours) est curieuse. Au 2e jour le microbe n'est pas dans le sang (culture et expérimentation). Il y est au contraire le 3e et 4e, puis il disparaît le 5e, si bien qu'on ne le trouve plus dans le sang à la mort. On sait que dans la maladie naturelle du veau, le microbe disparaît également du sang si la durée est un peu longue. Dans la septicémie lente du lapin (6 fois sur 6), la diarrhée apparaît vers le 3e jour et contient le cocco-bacille (inoculation) jusqu'à la fin. Il y a un foyer intestinal de culture, reliquat de la septicémie. Il en est de même dans la maladie naturelle.

Même fait pour l'arbre bronchopulmonaire. Ainsi, 6 fois sur 6, il existait de la congestion pulmonaire et le mucus trachéal et bronchitique contenait le cocco-bacille (pur 3 fois, 3 fois accompagné de staphylocoque). Cette recherche a été faite par la méthode de Gram, la culture et l'expérimentation.

Deux autres cas identiques présentaient en plus de la pleurésie purulente gauche avec péricardite. Les fausses membranes ne contenaient que le cocco-bacille. (Gram; culture: expérimentation.)

Donc, dans la septicémie lente du lapin, obtenue avec des cultures chauffées 1 heure à 70°, le cocco-bacille disparaît rapidement du sang et vient se cultiver en deux foyers : intestinal d'une part et broncho-pulmonaire d'autre part.

Devant cette persistance de la pasteurella dans l'arbre bron-

chique (obs. XXI), il y a lieu de se demander si elle n'entre pas pour une part très importante dans la production des accidents pulmonaires que l'on voit apparaître, à échéance variable, dans la convalescence de la maladie que souvent on croit terminée. On tend à admettre, depuis les recherches de Lignières, que ces lésions pleuropulmonaires sont dues à des infections secondaires. L'inoculation de la lésion pulmonaire au lapin lèvera les doutes. Nous n'avons pas été à même de faire cette étude.

Vaccination du veau contre la maladie. — Nous avons vu (obs. XXV) plus haut que l'inoculation sous-cutanée de 4 fortes doses de cultures actives chauffées à 60° (1 heure) n'avait aucune action vaccinale.

Il y a donc lieu de chercher un autre moyen, d'autant que cette inoculation produit des abcès très longs à se cicatriser. On peut y parvenir à l'aide de l'injection intra-veineuse.

Ainsi (obs. XXIX) une première dose de 1/2 c. c. de bouillon de culture chauffé à 70° (1 heure), suivie d'une 2e dose de 1 c. c. 8 jours après, et d'une 3e dose de 1 c. c. de la même culture chauffée à 60° (1 heure), 8 jours après, peut vacciner contre une dose active, septique, vivante de cocco-bacille. Cette dernière injection provoque, pendant 24 à 48 heures, une légère accélération thermique, un peu de diarrhée, de l'anorexie et du *gonflement articulaire*. Puis tout rentre dans l'ordre. Si tous les 8 jours on continue la même expérience, les mêmes phénomènes légers apparaissent. Cette vaccination expérimentale est donc lente, difficile : elle n'est qu'une pâle reproduction de ce qui se passe dans la maladie naturelle. Ainsi M. Nocard a observé en Irlande un veau, guéri de la maladie, qui a résisté à l'injection intra-veineuse d'une dose mortelle du microbe.

CONCLUSIONS

Le terme entérite des veaux doit être rejeté, car il n'indique qu'un côté de la maladie ; de même le terme de septicémie, qui ne montre point la période phlébitique et la période des accidents pulmonaires. Le mieux est de conserver le terme de « diarrhée des veaux », sur lequel tout le monde s'entend. Quelle que soit son évolution, rapide en 1 à 2 jours ou lente en 8, 15, 20 jours, la maladie est due, chez les veaux nouveau-nés, à la pénétration, par la plaie ombilicale, dans le système sanguin,

d'une pasteurella. Il y a une première période de phlébite ombilicale pasteurellique, dont la durée est variable, puis la culture passe dans le sang, à dose massive ou fractionnée. Suivant ces éventualités, la marche de la maladie sera courte ou longue. La septicémie sanguine persistante aboutit à la mort. Elle peut disparaître, et la pasteurella peut continuer à se cultiver en deux foyers (intestinal et broncho-pulmonaire).

Chez les veaux plus âgés, il y a lieu de penser que la porte d'entrée de la pasteurellose est la voie nasale.

Dans un travail ultérieur, nous étudierons les relations qui existent entre cette pasteurella des jeunes veaux et les pasteurelloses déjà connues.

Observation I. — Veau de 10 jours n° 1, de Barcelone. — 13 janvier 1901. Diarrhée datant de 6 jours. — Mort le 16 janvier.

Sang. — Cultures : rares de pasteurella, quelques-unes de staphylocoque. — Inoculation au lapin positive en 3 jours.

Diarrhée. — Lame (méthode de Gram) : à l'exception de quelques rares bacilles colorés, tout se décolore. — Culture : *B. coli* seul, pas de pasteurella. — Inoculation au lapin positive en 48 heures.

Matières fécales filtrées à F : *filtrat* clair, ne donnant aucune culture. — Inoculation au lapin négative.

Obs. II. — Veau de 8 jours, n° 2, de Barcelone. — 13 janvier 1901. — Diarrhée datant de la naissance. — Mort le 14.

Sang. — Culture : aucune culture de pasteurella, quelques cultures de staphylocoque. — Inoculation au lapin positive en 48 heures.

Diarrhée. — Lame (méthode de Gram) : tout est décoloré. — Culture : *B. coli* seul, pas de pasteurella. Inoculation au lapin positive en 24 heures.

Filtrées à F, les matières fécales donnent un liquide clair, ne donnant aucune culture. — Inoculation positive au lapin en 5 jours.

Mucus bronchique. — Lame (méthode de Gram) : quelques rares pneumocoques, staphylocoques nombreux, abondance de cocco-bacilles recolorés par l'éosine. — Culture : rares cultures de pasteurella, staphylocoques. — Inoculation au lapin positive en 48 heures.

Filtrat : clair, sans culture. — Inoculation positive en 3 jours.

Obs. III. — M. Parent, de Malesherbes. — 29 novembre 1900. — Veau de 13 jours. — Diarrhée dès la naissance. — Mort le 13e jour.

Diarrhée. — Lame (méthode de Gram) : quelques bacilles colorés; la majorité des microbes se décolorent. — Culture : *B. coli*, pas de pasteurella. — Inoculation positive au lapin.

Filtrat : clair, sans culture. — Inoculation négative.

Obs. IV. — Veau de M. Boissière. — 10 avril 1901. — Sang en culture :

B. coli et cocco-bacille en petite quantité. — Inoculation du sang au lapin : septicémie à cocco-bacille pur, mort de l'animal en 24 heures. — Inoculation de la culture colienne : aucun résultat; elle ne contient donc pas le cocco-bacille. — Sang allongé de bouillon, filtration sur bougie : filtrat clair, ne donnant pas de culture; inoculé au lapin : mort le 15 avril, septicémie à cocco-bacille pur.

Diarrhée : Coloration : quelques bacilles colorés au Gram, la majorité des microbes se décolorent. — Culture : *B. coli* seul. — Pas de cocco-bacille. Inoculation au lapin : mort en 48 heures (abcès sous-cutané contenant quelques staphylocoques, du *B. coli* et le cocco-bacille). — Présence de ce dernier seul dans le sang et les viscères.

Obs. V. — Veau arrivé à Alfort le 21 mars 1900. — Diarrhée intense, blanche, décolorée. — Odeur nauséabonde dégagée par l'animal. — Température : matin, 38°, 2; soir : 38°, 6. — L'animal reste sur le flanc, ne boit pas. — Mucus nasal léger. — État sérieux (Professeur Moussu). — Dos creux, museau froid. — Amaigrissement intense.

Prise de sang. — Culture : rare de pasteurella, quelques staphylocoques. — Inoculation positive en 48 heures.

Diarrhée. — Lame (Gram). — Peu de microbes colorés; la majorité se décolore. — Culture : *B. coli.* — Inoculation positive en 24 heures.

Filtrat. — Clair, sans culture. — Résultat positif en 4 jours. — 22 mars 1900. — L'animal meurt à 8 heures. — Autopsie : aucune lésion des viscères, sauf à l'intestin grêle, qui est rouge, congestionné à sa face externe, muqueuse gris jaunâtre, recouverte d'une couche de desquamation. — Grattée, on note qu'elle est congestionnée. — 100 grammes environ d'urine dans la vessie : traces d'albumine, pas de sucre.

Prise du *sang* dans le cœur. — Cultures : rares de pasteurella, très rares de staphylocoque.

Inoculation : mort en 16 heures, septicémie pure à pasteurella.

Mucus trachéo-broncho-pulmonaire. — Lame (méthode de Gram) : quelques staphylocoques en amas, abondance de cocco-bacilles recolorés par l'éosine.

Culture : abondantes de pasteurella. — Quelques cultures de staphylocoque. — Inoculation : positive en 24 heures, septicémie pure à pasteurella.

Intestin grêle. — Lame (Gram). — Tout se décolore ; cellules de desquamation abondantes.

Culture : coli-bacille seul. — Pas de pasteurella.

Inoculation : en 24 heures. — Septicémie positive.

Urine. — Coloration : staphylocoque. — Culture : *idem.* — Inoculation négative.

Rein. — Culture : staphylocoque seul. — Inoculation négative.

Rate. — Quelques cultures de pasteurella. — Cultures abondantes de staphylocoque. — Inoculation de l'organe. — Septicémie positive.

Foie. — Pas de pasteurella. — Cultures de *B. coli*. — Inoculation négative.

Obs. VI. — Veau arrivé à l'agonie, à Alfort, le 27 mars 1900. — Diarrhée des veaux. — Température : 35°. — Il est sacrifié de suite.

Sang. — Culture : *B. coli* seul. — Inoculation : septicémie pure à cocco-bacille, mort en 24 heures. — Inoculation de la culture colienne au lapin : septicémie cocco-bacillaire pure en 48 heures; donc cette culture était impure et contenait le cocco-bacille. — L'inoculation du sang au cobaye sous la peau tue en 6 jours : septicémie à cocco-bacille.

Diarrhée : Coloration du contenu de l'intestin grêle : cellules de desquamation abondantes. — Pas de microbes colorés au Gram : tous sont décolorés. — Culture : *B. coli* seul. — Inoculation de la diarrhée au lapin. Mort en 48 heures. Septicémie à cocco-bacille pur. — Inoculation de la culture colienne : septicémie identique en 24 heures; donc la culture contient le cocco-bacille. — *Filtrat* de la diarrhée, clair, ne donnant aucune culture, — aucune action chez le lapin ni le cobaye.

Mucus trachéal et nasal. — Coloration au Gram : quelques staphylocoques, les autres microbes se décolorent. — Culture : *B. coli* et cocco-bacille. Inoculation au lapin : septicémie à cocco-bacille pur, mort en 24 heures. — Filtrat clair, ne donnant aucune culture : résultat expérimental négatif.

Les viscères (foie, rate, rein, urine) donnent des cultures de *B. coli* seul. — L'inoculation du broyage de chacun de ces organes au lapin tue en 48 heures, sauf pour l'urine, dont le résultat est négatif : ces trois cas donnent une septicémie à cocco-bacille pur.

Obs. VII. — Février 1899. — Clinique de M. le Dr Moussu. Veau atteint de diarrhée peu colorée. — Odeur nauséabonde dégagée par l'animal. — Température : 38°. — Pas de signes d'infection sérieuse. L'animal boit peu, reste plutôt couché. Léger écoulement du mucus nasal.

5 mars. — *Prise de sang.* — Culture du cocco-bacille, en petits points. — Inoculation au lapin : mort en 24 heures. — Septicémie cocco-bacillaire pure.

Diarrhée. — Coloration : au Gram, peu de microbes colorés; la majorité se décolore. — Culture : *B. coli* seul. — Inoculation : septicémie cocco-bacillaire pure, mort en 24 heures. — *Filtrat* clair, ne donnant pas de culture. — Inoculation : mort du lapin en 3 jours : septicémie cocco-bacillaire pure.

Mucus. — Coloration : staphylocoques abondants. — Cocco-bacilles décolorés nombreux. — Inoculation : mort en 48 heures. — Septicémie cocco-bacillaire pure. — *Filtrat* clair, ne donnant pas de culture, inoculation négative. — Les jours suivants, l'animal se rétablit peu à peu. — Le 10 mars, reprise du sang. — Pas de culture. — Inoculation négative : le cocco-bacille est disparu. — Il est encore dans le mucus et la diarrhée : septicémies positives. L'animal guérit.

Obs. VIII — 1er Veau, M. Salmon. — 9 avril 1900. — Diarrhée des veaux.

Prise *du sang* pendant la vie. — Culture : cocco-bacille abondant, quelques rares cultures de *subtilis*. — Inoculation du sang au lapin : mort en 48 heures, septicémie cocco-bacillaire.

Diarrhée : coloration : méthode de Gram. — Rares bacilles colorés, tous

les microbes se décolorent. — Culture : *B. coli* et rares cultures de cocco-bacilles. — Inoculation : septicémie avec mort en 24 heures, à cocco-bacilles purs. — Diarrhée filtrée : *filtrat* clair, ne donnant pas de culture ; inoculation : septicémie, mort en 5 jours, cocco-bacille pur.

Obs. IX — 2e Veau, M. Salmon. — 11 avril 1900. — Diarrhée des veaux. — Prise *du sang* pendant la vie. — Culture : cocco-bacille pur, en notable quantité. — Sang allongé de bouillon, soumis à la filtration : *filtrat* clair ne donnant aucune culture. — Inoculation : résultat négatif.

Diarrhée. — Coloration : méthode de Gram, aucun microbe coloré. — Culture : *B. coli* seul, pas de cocco-bacille. — Inoculation : septicémie, mort en 24 heures, cocco-bacille pur. — Inoculation de la culture colienne : septicémie, en 48 heures, à cocco-bacille pur ; donc la culture du *B. coli* est impure et contient le cocco-bacille. — *Filtrat* clair, ne donnant pas de culture. — Inoculation, septicémie en 3 jours, à cocco-bacille pur.

Obs. X. — 3e Veau, M. Salmon. — 11 avril 1900. — Diarrhée des veaux.

Diarrhée : — coloration : rares bacilles colorés. — Tous les microbes sont décolorés. — Culture : *B. coli* ; rares cultures de cocco-bacille. — Inoculation : mort en 48 heures, septicémie à cocco-bacille pur.

Filtrat clair, ne donnant pas de culture. — Septicémie en 4 jours à cocco-bacille.

Obs. XI. — M. Delizy. — Diarrhée des veaux. — Depuis 2 jours. — Veau très malade. — Température : 36°,4. — Mort le 20 mars 1900.

Pendant la vie 16 mars. *Diarrhée.* — Coloration : méthode de Gram, tout se décolore. — Culture : *B. coli* et rares cultures de pasteurella. — Inoculation : mort en 24 heures. Septicémie à cocco-bacilles. — *Filtrat* clair, sans culture. — Inoculation : résultat négatif.

Mucus nasal. — Coloration : quelques streptocoques et staphylocoques ; cocco-bacilles décolorés abondants par la méthode de Gram. — Culture : staphylocoque et cultures nettes de pasteurella. — Inoculation : septicémie à cocco-bacille pur. — Mort en 24 heures. — *Filtrat* clair, sans culture ; inoculation, résultat négatif.

Obs. XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII. — M. Barbellion. — Étude de jeunes veaux atteints de la maladie, dans une même étable (mars 1900).

Chez trois, on a pris *du sang* pendant la vie. — Cultures : quelques cultures de *subtilis* et cultures nettes de pasteurella. — Inoculation des trois sangs. — Septicémie pure à cocco-bacille et mort de l'animal en 24 heures.

La *diarrhée* de ces 6 veaux a été examinée. — Coloration : quelques rares amas de staphylocoques et de bacilles. — La presque totalité des microbes se décolore par le Gram. — Cultures : *B. coli* seul. — Pas de cocco-bacilles. — Inoculation des matières fécales : septicémie pure à cocco-bacille, mort variant entre 2 et 3 jours. — Les cultures coliennes inoculées dans les six cas ont donné la septicémie pure à cocco-bacille. Donc les cultures étaient impures et contenaient la pasteurella.

Filtrat : 4 sur 6, et clairs, sans culture, ont reproduit en 4, 5 et 6 jours la septicémie à cocco-bacille.

Obs. XVIII. — M. Barbellion. — Un veau de 8 mois, au contact des premiers, a donné des signes de la maladie.

Diarrhée : culture : *B. coli* seul. — Inoculation : septicémie positive à cocco-bacille avec mort de l'animal en 48 heures.

Obs. XIX. — Veau, Delmer, de Gretz. — 5 avril 1900. — Diarrhée des veaux. — Prise *du sang* pendant la vie : culture nette de pasteurella. — Inoculation : septicémie positive à cocco-bacille en 24 heures. — *Diarrhée :* coloration, méthode de Gram : tous se décolorent. — Culture : *B coli* et rares cultures de pasteurella, — Inoculation : septicémie à cocco-bacille pur et mort en 3 jours. — *Filtrat* clair, ne cultivant pas; inoculation : mort en 4 jours, septicémie pure à cocco-bacille.

Mucus nasal. — Coloration : très rares staphylocoques, cocco-bacilles nombreux décolorés, (méthode de Gram). — Culture : staphylocoque — Rares cultures de cocco-bacille. — Inoculation : septicémie à pasteurella pure, mort en 24 heures.

Filtrat clair, ne cultivant pas. — Inoculation : mort au 6e jour : cocco-bacille pur.

Obs. XX. — Clinique de M. le professeur Moussu. — 20 février 1901. — Veau atteint de diarrhée. — Peu de signes généraux. Température : 38°,2 matin ; 38°,5 soir. — L'animal boit peu, a beaucoup de diarrhée.

Le 21 février. — Etat stationnaire. — Température : 38° matin ; 38°,6 soir. — Une prise *de sang* est faite. Culture : cocco-bacille. — Inoculation positive en 48 heures.

Mucus nasal. — Méthode de Gram : quelques rares bacilles colorés, staphylocoques abondants. — Nombreux cocco-bacilles colorés à l'éosine. — Culture : staphylocoques seuls, cultures discrètes de pasteurella. — Inoculation positive en 48 heures. — *Filtrat* clair, sans culture, inoculation négative. — *Diarrhée.* — Méthode de Gram : rares bacilles colorés ; la majorité des microbes se décolore. — Cultures : *B coli* seul, pas de pasteurella. — Inoculation positive en 24 heures. *Filtrat :* inoculation négative.

Le 22 février et jours suivants : état stationnaire. — L'amaigrissement augmente, la température oscille entre 38° et 38°,5.

Le 27 février, l'animal étant dans le décubitus permanent, on le tue par une large saignée.

Autopsie immédiate. — Viscères normaux; — l'intestin grêle est rouge, congestionné; desquamation de la muqueuse.

Sang. — Culture : pasteurella seule. — Inoculation positive en 24 heures. — *Diarrhée :* mêmes caractères que pendant la vie.

Mucus trachéal, même caractère que le mucus nasal pendant la vie. — Le foie, la rate, le rein et l'urine ensemencés ne donnent aucune culture.

L'ombilic ne présente pas d'abcès; les veines ombilicales sont le siège d'une phlébite qui s'étend jusqu'à la vessie (veine dure, épaisse, remplie

d'un caillot fibrineux, solide, résistant). — Culture : à l'entrée : *B. coli*, staphylocoque et pasteurella. — Inoculation positive. — A 1 centimètre de la porte d'entrée, dans toute l'étendue du caillot, en différents points, culture pure de pasteurella ; inoculation positive.

Obs. XXI. — Le 20 février 1901. — Clinique de M. le professeur Moussu. — Veau ayant de la diarrhée depuis au moins 20 jours.

Absence d'état général. Tout se réduit à la diarrhée. Prise *du sang* le 21 février. — Culture nulle. — Inoculation négative.

Diarrhée. — Culture : *B. coli* seul ; pas de pasteurella. — Inoculation négative. — *Mucus nasal.* — Examen direct : staphylocoques et cocco-bacilles décolorés par le Gram. Culture : staphylocoque seul. — Inoculation positive. — Cette observation est intéressante, car elle montre qu'après un certain nombre de jours, le microbe disparaît du sang, de l'intestin, et peut se localiser aux voies respiratoires. Depuis le veau est mort de complications pulmonaires.

Obs. XXII. — 8 janvier 1901 (clinique de M. le professeur Moussu), à 10 heures matin, inoculation sous-cutanée à un veau de 4 jours, bien portant, de 1/10e de culture sur gélose grattée (culture de 24 heures à 37° de la pasteurella, exaltée par passage par lapins).

5 heures soir. — 40°, état général mauvais, extrémités froides, prostration, inappétence, vomissements de lait, diarrhée intense un peu sanguinolente, jetage.

Le 9 janvier. — Matin : 39°,8. — Soir : 40°. — État stationnaire.

Le 10 janvier. — Matin : 39°,6. — Soir : 39°,4. — État stationnaire. — Cependant le veau semble plus gai et cherche à téter. — Conjonctives injectées, cornée intacte.

Les 11, 12, 13 janvier. — État stationnaire, matin : 39°,2. — Soir : 39°. — Amaigrissement intense, aucune alimentation, diarrhée forte et à peine colorée. — Aucune odeur.

Le 14 janvier. — Matin. — Agonie. — On le tue.

Recherches bactériologiques. — Pendant la vie (les 3e et 5e jours) *sang* en culture : quelques colonies de cocco-bacilles. — Pas de *B. coli.* — Septicémie, après inoculation au lapin, cocco-bacille pur, mort en 24 heures.

Mucus du jetage. — Coloration : rares staphylocoques, cocco-bacilles décolorés abondants (méthode de Gram). — Culture : staphylocoque et rares pasteurella. Inoculation : septicémie pure à cocco-bacille, mort en 24 heures. — *Filtrat :* clair, sans culture. — Inoculation négative.

Diarrhée : toute la flore est décolorée par la méthode de Gram. — Culture : *B. coli* et rares cultures de pasteurella. — Inoculation : septicémie à cocco-bacille pur, mort en 24 heures. — *Filtrat :* inoculation négative.

Le 5e jour de la maladie. — Mêmes prises, résultats identiques.

Autopsie. — Ombilic intact. — Viscères normaux, simplement congestionnés. — Intestin grêle rouge, congestionné, aplati, contracté ; desquamation abondante de la muqueuse. Tous les microbes se décolorent par le Gram. — Culture : *B. coli* seul, pas de pasteurella. — Inoculation du contenu

de l'intestin grêle : septicémie à cocco-bacille pur, mort en 24 heures. — Inoculation de la culture colienne : même septicémie. — Donc cette culture colienne est impure et contient le cocco-bacille. — Cultures du foie, rein, rate : rares cultures de la pasteurella, cultures de *B. coli* et de staphylocoque; — chacun de ces organes, broyé, inoculé : septicémie à cocco-bacille.

Sang : cocco-bacille pur. — Rares cultures de *B. coli.* — Mucus trachéal : coloration au Gram : rares staphylocoques, cocco-bacilles abondants, décolorés. — Culture : staphylocoques et pasteurella. — Inoculation : septicémie pure à cocco-bacille, mort en 48 heures.

Abcès de l'encolure (porte d'entrée), ferme, sec, dur, sans suc. — Au Gram, rien que des cocco-bacilles décolorés. — Culture pure. — Inoculation : septicémie pure.

Filtrats de la diarrhée et du mucus trachéal, — clair, aucune culture, résultat négatif à l'inoculation.

Obs. XXIII. — Clinique de M. le professeur Moussu. — Veau de 6 jours, de race normande : bien portant. — 7 janvier 1901, 9 heures matin. — Inoculation sous-cutanée de deux cultures (*B. coli* et cocco-bacille atténué) mélangées au moment même. — Température : 39°.

Soir, 39°,9. — Signes généraux graves, essoufflement, poil piqué et sec, mufle sec, extrémités froides, diarrhée abondante séreuse blanc jaunâtre avec fragments alimentaires, inappétence, vomissements de lait, décubitus.

Le 8 janvier. — Matin : 39°. — Soir : 38°,2. — État stationnaire, la diarrhée devient sanguinolente.

Les 9, 10, 11, 12 janvier, la température oscille entre 38°,2 et 39°,2. — 9, matin : 38°,6; soir : 39°,2. — 10, matin : 39°,2; soir : 38°,4. — 11, matin : 38°,5; soir : 38°,2; — 12, matin : 38°,5; soir : 38°,4. — Apparition du jetage. — État stationnaire, amaigrissement, odeur nauséabonde.

Le 13 janvier. — Matin : 38°,4. — Agonie. — On tue.

Recherches bactériologiques. — Au 2e jour et au 5e jour, résultats suivants identiques :

Diarrhée. — Au Gram, tous les microbes sont décolorés. — Cultures : très rares de pasteurella, abondantes de *B. coli.* — Inoculation : mort en 24 heures, septicémie à pasteurella pure. — *Filtrat :* aucun résultat expérimental. — Mucus nasal : coloration au Gram : rares staphylocoques, cocco-bacilles décolorés abondants. — Cultures : staphylocoques et pasteurella. — Inoculation, mort en 48 heures, septicémie à cocco-bacille. — *Sang.* — Culture : cocco-bacille pur. — Inoculation positive en 24 heures.

Autopsie. — Ombilic intact. — Organes congestionnés. — Desquamation abondante de la muqueuse de l'intestin grêle; contenu : tout se décolore. — Inoculation positive, septicémie à cocco-bacille en 24 heures. — Culture : *B. coli* seul, pas de pasteurella. — *Filtrat* du contenu intestinal, aucun résultat expérimental. — *Sang.* — Culture : cocco-bacille seul. Septicémie positive en 24 heures. — Les organes (foie, rate, rein). Culture de *B. coli*, de staphylocoque et du cocco-bacille. — *Mucus trachéal.* — Coloration : tout se décolore. — Cultures : cocco-bacille et quelques staphylocoques. — Inoculation : septicémie positive en 48 heures. — *Abcès*

sous-cutané du cou; coloration au Gram : tout se décolore. — Culture : *B. coli* et cocco-bacille. — Inoculation : septicémie positive en 24 heures.

Obs. XXIV. — Clinique de M. le professeur Moussu. — 18 février 1901 à 10 h. matin, inoculation, dans la jugulaire d'un veau de 13 jours, de 10 c. c. de bouillon de culture du cocco-bacille de 48 heures à 37°.

Le soir à 6 heures : 38°,8, inappétence, essoufflement, tremblements musculaires des membres postérieurs. — Mufle sec, poil piqué, diarrhée violente sanguinolente, odeur infecte, décubitus permanent.

Le 19 février. — État stationnaire. — Matin : 39°. — Soir : 39°,8.

Le 20 février. — État stationnaire. — Matin : 39°,5. — Soir : 39°,6. — Prise de sang, qui tue le lapin en 24 heures, septicémie à cocco-bacille.

Le 21 février. — Matin : 38°,8 — Soir : 39°,2. — L'animal semble aller mieux, prend un peu de lait et se lève. — Jarret gauche augmenté de volume : peau rouge et tendue, palpation douloureuse, culs-de-sac distendus. — Ponction aseptique : culture de la pasteurella, qui tue le lapin en 24 heures.

Le 22 février. — Matin : 38°,4. — Soir : 38°. — Animal refroidi, agonisant. — Mort le soir.

Autopsie. — Tous les viscères sont congestionnés. — Intestin rouge, congestionné, muqueuse desquamée. — Sang : inoculation positive à un lapin. — La culture montre la présence de ce microbe, dans la rate, le foie, et la jointure malade.

Contenu intestinal : à la méthode de Gram, tout est décoloré. — Culture : *B. coli* seul. Inoculation du contenu et de la culture colienne : septicémie à cocco-bacille pur, mort en 24 heures. La culture colienne est donc impure.

Mucus trachéal. — Au Gram, quelques pneumocoques et nombreux cocco-bacilles décolorés. — Cultures : staphylocoque et pasteurella. — Inoculation positive au lapin. — A noter que l'*ombilic est sain.*

Obs. XXV. — Clinique de M. le professeur Moussu. — Le 7 janvier 1901, inoculation sous-cutanée à un veau, âgé de 6 jours, bien portant, de 1 c. c. de bouillon de culture de 24 heures à 37°. — Aucun retentissement sur l'état général. — Lésion locale seule. — Petite induration. — Le 10 janvier nouvelle expérience avec 5 c. c.; résultat identique : l'induration est plus marquée. — Une prise de sang faite le lendemain de chaque inoculation ne permet pas de reconnaître la présence de la pasteurella, ni par la culture ni par l'expérimentation.

Le 16 janvier. — Inoculation de 5 c. c. chauffé à 60°, mêmes résultats; le 17, aucune pasteurella dans le sang.

Le 26 janvier. — Le matin, 1 c. c. de bouillon de culture de 24 heures à 37°, en injection intra-veineuse (jugulaire). — 38° avant l'injection. — A midi : essoufflement, accélération de la circulation, diarrhée sanguinolente, décubitus complet. — État général grave. — A 4 heures : 39°.

Le veau meurt dans la nuit.

Le 27 janvier. — Autopsie. — Tous les viscères sont congestionnés. — intestin grêle rouge hémorragique. — Desquamation de la muqueuse.

Sang. — Culture : *B. coli* seul. — Inoculation du sang : septicémie à cocco-bacille pur avec mort en 24 heures. — Inoculation de la culture colienne : septicémie identique.

Tous les organes (foie, rate, rein, urine) ne donnent que des cultures de *B. coli.* — *Contenu intestinal :* au Gram, quelques microcoques colorés, le reste des microbes est décoloré. — Culture : *B. coli* seul. — Inoculation du contenu : septicémie à cocco-bacille. — *Filtrat :* inoculation négative.

Mucus trachéal. — Au Gram, quelques pneumocoques, abondance de cocco-bacilles décolorés. — Culture : staphylocoque *B. coli.* Pas de pasteurella. — Inoculation : septicémie à cocco-bacille pur, avec mort de l'animal en 24 heures. — *Filtrat :* inoculation négative. — A noter que l'*ombilic est intact.* — Cette expérience est intéressante, car elle montre que l'inoculation sous-cutanée de cultures chauffées ou non ne vaccine pas contre l'injection intra-veineuse.

Obs. XXVI. — M. le professeur Moussu, le 15 mars 1901, met à un veau, nouveau-né de quelques heures, sur la plaie ombilicale, un pansement imbibé de bouillon de culture de la pasteurella.

Le veau présenta de la diarrhée et mourut avec les signes de la maladie le 30 mars. L'autopsie n'a pas été étudiée.

Le 20 avril, pansement identique à un nouveau-né. — Le samedi 20, au matin, température : 38°. Le soir : 39°.2. État général sérieux, décubitus latéral constant, diarrhée abondante ; l'animal vomit tout ce qu'on lui ingurgite de force.

Le 21 et 22. — Persistance des signes généraux et diarrhéiques. — Refroidissement. — Température : matin : 37,°4 soir. — Soir : 37,°8. — Un peu de mucus nasal.

Prise de sang. — Culture : pasteurella seule — Inoculation positive.

Diarrhée : lame : quelques rares microcoques colorés par la méthode de Gram, nombreux bacilles décolorés. — Culture : staphylocoques et *B. coli* — Inoculation positive. — *Filtrat :* résultat négatif.

Mucus nasal. — Coloration par la méthode de Gram : staphylocoques nombreux colorés. — Peu de cocco-bacilles. — Inoculation négative.

Le 22 au soir, collapsus et mort de l'animal dans la nuit.

Obs. XXVII. — Samedi 20 avril, M. le professeur Moussu inocule à l'entrée du cordon d'un nouveau-né de quelques heures quelques gouttes de bouillon de culture du microbe. — Température : 38°,2. — Soir : 38°,3. — Aucun changement.

Le 21 avril. — Le veau boit moins. — Température : matin : 38°,4. — Soir : 38°,5. — Rien de nouveau.

Le 22 avril — Quelques vomissements, l'animal ne boit pas, légère diarrhée.

Le 23 avril. — Température : matin : 38°,6. — Soir : 39°,2. — La diarrhée augmente, blanche, le veau reste dans le décubitus, amaigri, ne buvant plus. — L'ombilic est gros, induré.

Sang pris. — Culture : pasteurella pure ; inoculation positive.

Diarrhée. — Coloration : rares bacilles colorés au Gram. — La majorité

des microbes se décelore. — Culture : *B. coli* seul, pas de pasteurella. — Inoculation positive. — *Mucus nasal.* — Inoculation négative.

Le 24 avril. — Matin : 39°,2. — Soir : 39°. — État aggravé, essoufflement, refroidissement, diarrhée intense.

Le 25 avril. — 38°,8. — Agonie. — On tue l'animal. — Le *sang* et la *diarrhée* (intestin grêle) donnent les mêmes résultats que précédemment.

Mucus trachéal. — Coloration par la méthode de Gram : tout se décolore. — Culture : cocco-bacille seul, inoculation positive.

Les viscères sont congestionnés, surtout l'intestin grêle (muqueuse desquamée). — Ensemencements du foie, de la rate : cultures positives de pasteurella. — Rein : pas de culture.

Ombilic. — A la porte d'entrée, petit abcès sec et ferme : tout se décolore au Gram. — Culture : pasteurella seule. — Inoculation positive. — Les veines sont grosses, fermes, remplies d'un caillot résistant. — Ensemencé en divers endroits, le caillot donne des cultures de pasteurella pure. — Inoculation positive.

Obs. XXVIII. — Clinique de M. le professeur Moussu. — Veau de 6 jours bien portant, n'ayant aucune induration ombilicale.

Le 23 avril 1901, 9 heures du matin, mise à nu de la saphène externe. — Un tronçon de 3 centimètres est fermé entre deux ligatures. — Antisepsie. — Injection dans ce tronçon d'une goutte de bouillon de culture de pasteurella de 24 heures à 37°. — Quelques points de suture cutanée. — Pansement antiseptique. — Température : 38° matin. — Soir : 38°,6.

Le 24 avril. — Température matin : 38°,4. — Soir : 38°6. — Aucun signe maladif. — On défait un point de suture supérieur (24 heures après). — Le caillot est d'ailleurs fait. — On enlève la ligature élastique la plus proche de la racine du membre.

Antisepsie. — Fermeture définitive de la plaie cutanée.

Le 25 avril. — Matin : 38°,6. — Soir : 38°,4. — Aucun accident local. — Légère induration de la région. — Pas de suppuration. — Antisepsie. — Aucun signe maladif, à part une légère augmentation thermique.

Le 26 avril. — Température : matin : 39°. — Soir : 39°,2. — Le veau boit moins.

Le 27 avril. — Température : matin : 38°,6. — Soir : 39°,3. — Le veau ne s'alimente plus, il a eu un vomissement. — Légère diarrhée.

Le 28 avril. — Température matin : 38°,5. — Soir : 39°,4. — Un peu d'essoufflement. — La diarrhée augmente, devient liquide, peu colorée. — Le veau maigrit. — Un peu de jetage. — Accélération des battements du cœur. — Le veau ne se lève plus. — L'état général devient sérieux.

Le 29 avril. — Température : matin : 39°. — Soir : 39°,2. — État général sérieux. — Aggravation. — Augmentation du jetage.

Le 30 avril. — Température : matin : 39°. — Soir : 39°,4. — Même état.

Le 1er mai. — Température : matin : 38°. — Soir : 38°,2. — Même état.

Le 2 mai. — Température : matin : 37°,6. — Agonie. — On tue l'animal.

Recherches bactériologiques. — *Prise du sang* le 24 : pas de pasteurella

(culture et expérimentation). — Le 26 : pasteurella. — Le 28 et le 1er mai : pasteurella pure. — Autopsie : résultat identique.

Diarrhée. — Le 28 avril. — Coloration : rares microbes colorés au Gram, les autres se décolorent. — Culture : *B. coli* seul, pas de pasteurella. — Inoculation positive en 24 heures. — Mêmes résultats le 30 et à l'autopsie.

Filtrat. — Aux mêmes jours. — Aucun résultat, inoculation négative.

Mucus nasal. — Le 28 et le 30, examen. — Coloration : quelques staphylocoques, nombreux cocco-bacilles décolorés au Gram. — Cultures : staphylocoques et rares cultures de pasteurella. — Inoculation positive. — *Filtrat.* — Résultat négatif. — Mêmes résultats à l'autopsie avec le mucus trachéal.

Autopsie. — Aucune lésion d'organe : l'intestin grêle seul est congestionné. — Desquamation de la muqueuse. — Culture du foie : *B. coli* seul. — Rate : pasteurella seule. — Rein et urine : aucune culture. — Ombilic intact. — Saphène : le caillot primitif s'est étendu de 10 centimètres environ vers la racine du membre. — Culture en cinq points différents : culture pure. — Inoculation positive. — Il y a là un foyer de culture de pasteurella.

Obs. XXIX. — Clinique de M. le professeur Moussu. — Veau bien portant de 25 jours, en observation depuis 15 jours. — Ombilic intact. — Le 12 avril 1901, inoculation dans la jugulaire de 1/2 c. c. de bouillon de culture chauffé 1 heure à 70°. — Aucun symptôme : l'animal boit moins pendant un jour. — 1/2 degré de température en plus pendant 24 heures. — Tout rentre en ordre.

Le 19 avril. — 1 c. c. de la même solution. — L'animal pendant deux jours à un accès thermique de 1°, avec anorexie et 2 selles diarrhéiques. Puis tout rentre dans l'ordre.

Le 26 avril. — 1 c. c. de la même solution, mais chauffée à 60° une heure. — Mêmes accidents légers qu'à l'inoculation précédente.

Le 2 mai. — 1, 1/2 c. c. de bouillon de culture active, septique. — Accès de fièvre pendant 48 heures, élévation de 1 degré, inappétence, un peu de diarrhée, gonflement articulaire du genou. — L'animal reste couché. — 48 heures après, tout est rentré dans l'ordre.

Le 10 mai. — Nouvelle injection identique. — Mêmes accidents identiques, mais de 1 jour de durée.

Le 18 mai. — Nouvelle injection : 2 c. c. — Mêmes accidents passagers.

N. B. — Dans toutes ces observations, le terme « inoculation positive » indique que l'animal est mort de septicémie pasteurellique pure.

ROLE DES TRICHOCÉPHALES

DANS L'INFECTION DE L'APPENDICE ILEO CŒCAL

PAR J. GIRARD

INTERNE DES HOPITAUX

M. Metchnikoff, dans une récente séance de l'Académie de médecine [1], a démontré le rôle important joué fréquemment par certains vers intestinaux, ascarides et trichocéphales, dans la genèse des phénomènes de l'appendicite. Cette démonstration, sur l'importance de laquelle il est inutile d'insister, emprunte ses données les plus convaincantes à des faits cliniques et à des faits anatomo-pathologiques. Nous avons été assez heureux pour pouvoir ajouter à ces derniers un cas absolument démonstratif, qui a permis à M. Metchnikoff d'apporter une nouvelle preuve à l'appui de sa séduisante conception, et de transformer en affirmation la supposition logique que la présence de trichocéphales ou d'ascarides dans l'intestin peut non seulement réaliser le syndrome de la colique appendiculaire, mais encore créer une inflammation véritable en jouant le rôle d'agent d'inoculation.

Becquerel [2], Davaine [3], puis Natale [4] avaient déjà signalé le passage d'ascarides dans la cavité péritonéale à la suite d'une perforation de l'appendice. Guersant [5] admet que les ascarides lombricoïdes peuvent s'engager dans l'appendice iléo-cæcal et causer des perforations. Mais ces faits avaient eu peu de retentissement, et Damaschino [6], posant la question du rôle pathogène des helminthes dans la typhlite, la résout par la négative.

« On a pensé que les vers intestinaux pouvaient occasionner la typhlite. Or les ascarides, c'est-à-dire les helminthes les plus

1. Note helminthologique sur l'appendicite, par M. El. Metchnikoff, *Bull. Ac. de méd.*, n° 10, séance du 12 mars 1901.
2. BECQUEREL, *Clinique des hôpitaux des enfants*, 1841, n° 3.
3. DAVAINE, *Traite des entozoaires*, Paris, 1877, p. 186.
4. *Centralblatt für innere medicin*, 1889, p. 317.
5. GUERSANT, *Diction. de médecine*, 1846, article Vers.
6. DAMASCHINO, *Mal. des voies digestives*, p. 756.

propres à se réunir en masses agglomérées, ne vivent pas dans le gros intestin. Seuls les trichocéphales et les oxyures y habitent, et l'on ne peut admettre que des animaux de si petite taille soient capables de produire de pareils effets; d'ailleurs, on les trouve surtout chez les enfants qui, vous le savez, sont rarement atteints de typhlite. Jusqu'à plus ample informé, l'helminthiase doit donc être écartée de cette étiologie. »

Cependant les chirurgiens, en particulier MM. Routier, Brun, Guinard [1], ont rencontré au cours d'opérations d'appendicite des vers nématodes dans la cavité de l'organe. La rareté de ces faits est vraisemblablement d'ailleurs plus apparente que réelle : depuis que l'attention est attirée sur ce point, des observations déjà nombreuses ont été publiées [2]. Nous croyons utile de rapporter *in extenso* le cas que nous avons pu observer et dont l'intérêt réside dans l'examen anatomo-pathologique de l'appendice [3].

Jeanne B..., âgée de 8 ans, convalescente de fièvre typhoïde et apyrétique depuis quinze jours, entre à l'hôpital des Enfants-Malades le 10 octobre 1900, pour une angine diphtérique de moyenne intensité. Pas de coryza, pas de croup. L'enfant présente à l'entrée un écoulement vaginal abondant, apparu dans le décours de la fièvre typhoïde, d'après les renseignements donnés par les parents. Sous l'influence du sérum antidiphtérique, la gorge se déterge rapidement et la malade paraissait définitivement guérie, lorsque, le 24 octobre, la température monte à 37°,8 en même temps que l'écoulement vaginal augmente. Le lendemain la température est à 38°,2, la palpation du ventre est douloureuse au niveau de la fosse iliaque gauche. Le 26, la température s'élève à 40°,1, les douleurs abdominales sont très violentes, toujours localisées à gauche. Le pouls est rapide; il n'y a pas de constipation. Après une légère rémission, les douleurs reparaissent, intenses; le 28, la température monte à 39°,5, les douleurs sont très violentes, la défense musculaire est très marquée, le facies grippé; le pouls, filiforme, bat 130 pulsations : l'enfant vomit à plusieurs reprises. Dans la soirée, la situation s'aggrave et la laparatomie est pratiquée d'urgence à 1 heure du matin. On trouve dans la cavité péritonéale un liquide louche, séro-purulent; les anses intestinales sont distendues, fortement congestionnées, à leur surface on observe quelques fausses membranes fibrineuses.

Pensant que peut-être l'appendice était en cause, une contre-incision est pratiquée au niveau de la fosse iliaque droite. La trompe droite paraît congestionnée, un peu tuméfiée. Il semble que le pus provienne de la cavité

1. Guinard, *Société de chirurgie*, séance du 7 novembre 1900.

2. J. Guiart, Le trichocéphale et les associations parasitaires, *Bull. de la Soc. de biologie*, séance du 16 mars 1901. — Motz, *Académie de médecine*, séance du 2 avril 1901.

3. Ce cas a été rapporté brièvement à la Société de biologie, séance du 9 mars 1901.

pelvienne. L'appendice iléo-cœcal, bien que d'apparence normale, est reséqué par précaution.

Après un large drainage quelques points de suture sont pratiqués. La température, les jours suivants, baisse peu à peu. Le 6 novembre, légère poussée fébrile et réapparition de douleurs du côté gauche; mais ces phénomènes sont de courte durée et, le 30 décembre, la fillette quitte l'hôpital complètement guérie.

L'appendice paraît absolument sain à l'œil nu; il est régulièrement cylindrique, sans renflement, sans étranglement. Après fixation en masse par le sublimé acétique, on constate, en le coupant par morceaux pour l'inclusion, que la cavité est libre dans sa partie supérieure, mais que, dans le tiers inférieur, sa lumière est occupée par 2 corps arrondis, accolés en canons de fusil.

L'examen microscopique montre que ces corps représentent la coupe transversale de 2 nématodes; en outre, dans l'épaisseur même de la muqueuse, on trouve une figure également arrondie, beaucoup plus petite que les 2 précédentes et représentant l'extrémité antérieure repliée de l'un des parasites.

M. le professeur Raillet, auquel nous avons présenté nos préparations, a eu l'obligeance de nous remettre la note suivante :

« La coupe comprend deux exemplaires de *trichocephalus hominis* (un mâle et une femelle) coupés dans la zone postérieure ou génitale du corps, plus une coupe de l'extrémité antérieure ou œsophagienne de l'un des deux. Cette dernière est même très instructive en ce sens qu'elle tranche la question encore discutée de savoir si les trichocéphales introduisent ou non leur extrémité antérieure dans la muqueuse. On voit ici que l'extrémité antérieure est dans l'épaisseur même de la muqueuse. »

L'appendice dans son ensemble est absolument sain; on n'observe aucune trace d'inflammation ancienne ou récente, sauf au point où l'extrémité antérieure du trichocéphale a pénétré dans la muqueuse. A cet endroit on constate la présence d'une zone enflammée où on rencontre un assez grand nombre de leucocytes mono et polynucléés, parmi lesquels quelques-uns montrent des noyaux avariés. Au milieu du détritus cellulaire, on observe toute une flore bactérienne dans laquelle on reconnaît de nombreux streptocoques, des bacilles ramifiés se colorant par le Gram, et de petits coccobacilles qui se décolorent

par cette méthode. L'inflammation autour du trichocéphale est donc due à l'inoculation des microbes intestinaux par le nématode. L'absence d'examen bactériologique de l'exsudat péritonéal, les constatations un peu vagues faites au cours de l'opération ne permettent pas de porter un diagnostic ferme dans ce cas : il ne nous semble pas, néanmoins, que ces lésions très limitées de l'appendice suffisent à expliquer les phénomènes péritonéaux graves observés chez notre malade, et dont les premiers symptômes étaient apparus quatre jours avant l'opération. La localisation constante des douleurs à gauche, l'exacerbation de la vulvite précédant l'apparition des phénomènes péritonéaux nous portent plutôt à admettre une péritonite d'origine génitale, vraisemblablement blennorrhagique. Mais cette supposition n'atténue en rien l'intérêt qui s'attache aux lésions appendiculaires en voie de formation.

En résumé, deux points sont mis nettement en valeur par le cas que nous venons de rapporter :

1° L'extrémité antérieure du trichocéphale peut pénétrer dans l'épaisseur même de la muqueuse ; c'est là un point encore discuté.

« Divers auteurs, entre autres Vix et Leukart, admettent que le ver transfixe la muqueuse du cæcum avec son extrémité antérieure ; ainsi s'expliquerait ce fait que le parasite ne s'observe jamais dans les selles : ainsi fixé à la muqueuse, il mourrait et se détruirait sur place. Klebs et Heller ne partagent pas cet avis ; les nombreuses observations que j'ai pu faire sur les singes et les ruminants, sur des espèces voisines du trichocéphale de l'homme, m'ont démontré clairement que la perforation n'avait pas lieu... Wichmann soutient la même opinion, non plus seulement par l'examen direct du ver *in situ*, mais d'après l'étude microscopique de ses relations avec la muqueuse. Le ver est englobé dans une masse mucilagineuse infiltrée de leucocytes et répandue à la surface de l'épithélium. Cette substance se condense même autour de lui en une sorte d'enveloppe d'aspect stratifié, mais nulle part on ne le voit s'enfoncer dans la muqueuse, et celle-ci ne présente en aucun endroit des lésions qui puissent être attribuées à ce que le ver a pénétré dans sen ntérieur. » (R. Blanchard, *Traité de pathol. générale de Bouchard*, t. II, p. 760.)

Notre observation prouve que chez l'homme cette pénétration a lieu ; Brumpt, d'ailleurs, a rencontré « très fréquemment des trichocéphales fixés dans la partie superficielle de la muqueuse du cæcum[1] » ;

2° Les trichocéphales, parasites vulgaires de l'intestin, peuvent comme les ascarides s'engager dans l'appendice. La pénétration de leur extrémité antérieure dans la muqueuse est un moyen simple et désormais incontestable d'inoculation.

Le parasite, par son habitat normal, joue le rôle de corps plus ou moins septique; il peut entraîner avec lui les microbes de la flore intestinale et amener des désordres graves.

Nous pouvons donc conclure, avec M. Metchnikoff, que non seulement les symptômes de la colique appendiculaire peuvent être provoqués par la présence de nématodes dans l'appendice, mais encore que les trichocéphales, en agissant comme agents d'inoculation, peuvent déterminer des lésions inflammatoires plus ou moins étendues, susceptibles d'entraîner des accidents.

Nous ne pouvons mieux faire en terminant que de rappeler les règles pratiques que M. Metchnikoff conseille de suivre :

1° Dans les cas suspects d'appendicite, pratiquer l'examen helminthologique des matières fécales;

2° Dans tous les cas où il y aura possibilité de le faire, appliquer le traitement du vermifuge (santonine contre les ascarides, thymol contre les trichocéphales);

3° Défendre aux personnes atteintes d'appendicite de manger des légumes crus, des fraises, etc., et de boire de l'eau non bouillie ou non filtrée ;

4° La proscription des aliments crus et des eaux impures constitue de même une excellente mesure prophylactique ;

5° Examiner de temps en temps, surtout chez les enfants, les selles, et leur administrer des vermifuges.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE IX

Fig. 1. Coupe de l'appendice, renfermant deux trichocéphales.

Fig. 2. Partie antérieure du trichocéphale, implantée dans la muqueuse de l'appendice.

Fig. 3. Partie de la même coupe que fig. 2. On voit le bord du trichocéphale et la région enflammée avec microbes et leucocytes.

1. J. Guiart, *Loc. cit.*

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR

EN 1900

PAR M. EUGÈNE VIALA

PRÉPARATEUR AU SERVICE ANTIRABIQUE

I

Pendant l'année 1900, 1,420 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 11 sont mortes de la rage; chez 6 d'entre elles, la mort est survenue moins de quinze jours après la fin du traitement, une personne a été prise de la rage pendant le cours du traitement; aucune de ces personnes ne sera comptée parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	1,413
Morts	4
Mortalité 0/0	0,28

Dans le tableau suivant, ces chiffres sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années	Personnes traitées	Morts.	Mortalité 0/0
1886	2,671	25	0,94
1887	1,770	14	0,79
1888	1,622	9	0,55
1889	1,830	7	0,38
1890	1,540	5	0,32
1891	1,559	4	0,25
1892	1,790	4	0,22
1893	1,648	6	0,36
1894	1,387	7	0,50
1895	1,520	5	0,33
1896	1,308	4	0,30
1897	1,521	6	0,39
1898	1,465	3	0,20
1899	1,614	4	0,25
1900	1,420	4	0,28

1. D'après les expériences faites sur les chiens, on est autorisé à penser que les centres nerveux des personnes mortes de rage dans les 15 jours qui suivent le traitement ont été envahie par le virus rabique avant que la cure ait pu avoir toute son efficacité.

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1900.

	Morsures à la tête.			Morsures aux mains.			Morsures aux membres.			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0
Tableau A.	20	0	0	109	3	2.75	50	1	2.00	179	4	2.23
Tableau B.	78	0	0	555	0	0	233	0	0	866	0	0
Tableau C.	28	0	0	188	0	0	159	0	0	375	0	0
	126	0	0	852	3	0.35	442	1	0.22	1.420	4	0.28

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,420 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre	14	Espagne	2
Allemagne	4	Grèce	2
Belgique	5	Indes anglaises	56
Danemark	2	Suisse	1

Soit 86 étrangers et 1,334 Français.

Voici la répartition par départements des 1,334 Français. Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que 5 instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois. Lille, Marseille, Montpellier, Lyon et Bordeaux drainent les mordus de la région environnante.

Ain	1	Loire-Inférieure	7
Aisne	5	Loiret	6
Allier	16	Lot	20
Alpes (Basses-)	0	Lot-et-Garonne	47
Alpes (Hautes-)	0	Lozère	7
Alpes-Maritimes	0	Maine-et-Loire	7
Alger	0	Manche	5
Ardèche	0	Marne	2
Ardennes	0	Marne (Haute-)	1
Ariège	0	Mayenne	3
Aube	1	Meurthe-et-Moselle	4
Aude	0	Meuse	3
Aveyron	8	Morbihan	10
Bouches-du-Rhône	0	Nièvre	4
Calvados	15	Nord	0
Cantal	23	Oise	15
Charente	13	Oran	0
Charente-Inférieure	8	Orne	2
Cher	4	Pas-de-Calais	2
Constantine	0	Puy-de-Dôme	33
Corrèze	23	Pyrénées (Basses-)	15
Corse	0	Pyrénées (Hautes-)	4
Côte-d'Or	7	Pyrénées-Orientales	1
Côtes-du-Nord	9	Rhin (Haut-)	0
Creuse	19	Rhône	1
Dordogne	20	Saône (Haute-)	2
Doubs	11	Saône-et-Loire	7
Drôme	4	Sarthe	1
Eure	4	Savoie	1
Eure-et-Loir	14	Savoie (Haute-)	0
Finistère	9	Seine	637
Gard	2	Seine-et-Marne	15
Garonne (Haute-)	11	Seine-et-Oise	124
Gers	9	Seine-Inférieure	10
Gironde	8	Sèvres (Deux-)	1
Hérault	0	Somme	6
Ille-et-Vilaine	1	Tarn	2
Indre	5	Tarn-et-Garonne	32
Indre-et-Loire	3	Var	0
Isère	7	Vaucluse	0
Jura	5	Vendée	12
Landes	21	Vienne	6
Loir-et-Cher	0	Vienne (Haute-)	10
Loire	3	Vosges	2
Loire (Haute-)	4	Yonne	15

PERSONNES PRISES DE RAGE EN COURS DE TRAITEMENT

Sidney Marcks, 28 ans, soldat à Chakrata (Indes anglaises). Mordu le 30 mars, 7 morsures sur le dos de la main droite qui ont beaucoup saigné, cautérisées au nitrate d'argent une demi-heure après; mordu par un chien déclaré suspect de rage, qui a été abattu le lendemain.

Sidney s'est présenté à l'Institut Pasteur le 22 avril; il a été traité ce jour-là et le 23 avril à 10 heures du matin; les premiers symptômes de rage se sont manifestés chez lui le 23 avril au soir, il est mort le 27 avril.

Le bulbe de Sidney, remis à l'Institut Pasteur, est inoculé à des lapins qui ont été pris de rage le 12e jour.

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE LA RAGE MOINS DE 15 JOURS APRÈS LE TRAITEMENT

PACHY (Théodore), 25 ans, lieutenant de cavalerie, Athènes (Grèce).

Mordu le 22 janvier 1900, sur le nez une morsure, par piqûre, qui avait saigné, la morsure a été lavée à l'eau de Cologne.

Traité à l'Institut Pasteur du 31 janvier au 20 février, les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 23 février; il est mort le 27 février.

Le chien qui avait mordu Pachy avait mordu une autre personne, qui a été traitée du 3 au 23 février; cette personne va bien.

Le bulbe du chien mordeur inoculé à un lapin a donné la rage après 14 jours d'incubation.

MARIAUD (Jean), 8 ans, chez ses parents, à Limoges (Haute-Vienne).

Mordu le 9 mars, à la joue droite une plaie pénétrante de 3 centimètres nécessitant 3 points de suture, a saigné : lavage une demi-heure après.

Mordu par un chien reconnu enragé par un vétérinaire, et le bulbe inoculé à des animaux a donné la rage 14 jours après.

Le même chien avait mordu une autre personne qui a été traitée du 12 au 29 mars; cette personne va bien.

Mariaud a été traité à l'Institut Pasteur du 12 mars au 1er avril. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui vers le 14 avril, il est mort le 18 ou le 19 avril.

LACLAUTRE (Marcelle), 5 ans, chez ses parents, menuisiers, 303, rue de Belleville, à Paris.

Mordue le 29 juin, à Paris par un chien reconnu enragé par M. Roudel, vétérinaire; plaies multiples à la figure, ont saigné beaucoup, non cautérisées,

Elle a été traitée à l'Institut Pasteur du 29 juin au 19 juillet. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 23 juillet; elle est morte le 26 juillet.

PIGNEGUY (Marceline), 12 ans, chez ses parents, à Masparraute (Basses-Pyrénées).

Mordue le 7 juin, par un chien errant reconnu enragé par M. Inda, vétérinaire à Saint-Palais : avant-bras droit une morsure et genou gauche une autre morsure, qui ont saigné, faites à travers des vêtements qui ont été déchirés par les dents du chien.

A été traitée à l'Institut Pasteur du 10 au 27 juin. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 4 juillet; elle est morte le 8 juillet.

Une autre personne mordue par le même chien, et traitée à l'Institut Pasteur du 10 au 27 juin, va bien.

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE LA RAGE MOINS DE 15 JOURS APRÈS LA FIN DU TRAITEMENT

GEORGES (Émilienne), 2 ans, chez ses parents, à Boulogne-sur-Seine.

Mordue le 13 septembre, au mollet gauche, à travers un bas; deux plaies pénétrantes qui ont saigné; chien reconnu enragé par M. Chobaud, vétérinaire à Boulogne; le bulbe de ce chien, inoculé à des animaux, a donné la rage le 18e jour.

Georges (Émilienne) a été traitée du 15 septembre au 2 octobre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 3 octobre; elle est morte le 5 octobre.

Une autre personne mordue par le même chien et traitée à l'Institut Pasteur du 15 septembre au 2 octobre va bien.

Paquignon (Lucien), 16 ans, chez ses parents, à Vierzon (Cher).

Mordu le 18 septembre, pouce droit, 5 morsures pénétrantes qui ont saigné, cautérisées au thermocautère 20 minutes après; mordu par un chien errant qui n'a pas été retrouvé.

Traité du 20 septembre au 7 octobre. Les premiers symptômes se sont manifestés chez lui le 21 octobre; il est mort le 26 octobre à une heure du matin.

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE RAGE APRÈS LE TRAITEMENT

Chuffart (Émile), 68 ans, concierge, rue Clavel, 19, Paris.

Mordu le 13 mars, main droite, éminence thénar, une morsure profonde de 1 centimètre qui a beaucoup saigné, morsure lavée à l'eau boriquée : le chien a été reconnu enragé par M. Millet, vétérinaire à Paris.

Traité à l'Institut Pasteur du 14 au 31 mai. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 13 août, il est mort le 16 août.

Chuffart était profondément alcoolique.

Pierre (Cécile), née Warcoin, demeurant rue Beuret, 18, à Paris.

Mordue le 13 août, poignet gauche et poignet droit, chacun une morsure profonde qui ont beaucoup saigné, lavées au sublimé un quart d'heure après; chien reconnu enragé par M. Huet, vétérinaire à Paris.

Traitée du 15 août au 1er septembre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 26 septembre; elle est morte le 1er octobre.

Une autre personne mordue à la joue droite par le même chien, et traitée à l'Institut Pasteur du 15 août au 4 septembre, va bien.

Marignane (Alfred), 50 ans, demeurant à Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme).

Mordu le 17 septembre à la main gauche, face dorsale et face palmaire, 3 morsures pénétrantes qui ont bien saigné, lavées à l'alcool le lendemain.

Mordu par un chien reconnu enragé par M. Tachet, vétérinaire à Clermont-Ferrand.

Traité à l'Institut Pasteur du 21 septembre au 8 octobre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 24 octobre; il est mort le 26 octobre.

Une autre personne mordue par le même chien, et traitée à l'Institut Pasteur du 21 septembre au 21 octobre, va bien.

Mamertz (Gustave), 37 ans, demeurant rue des Poissonniers, 129, à Paris.

Mordu le 18 janvier, à l'index droit, face dorsale, une plaie par piqûre bien pénétrante, qui a saigné, non cautérisée : mordu par un chien reconnu enragé par M. Coquillard, vétérinaire à Paris.

Traité du 22 janvier au 5 février. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 20 mars ; il est mort dans la nuit du 26 au 27 mars.

PERSONNES NON TRAITÉES MORTES DE LA RAGE

Vanet (Berthe), 40 ans, léchée le 21 octobre 1899 sur le dos de la main, où il y avait une petite éraillure, par un chien enragé. Prise de la rage le 20 janvier 1900, morte à l'hôpital Necker le 22 janvier.

Meyer, mordu au nez le 6 janvier par un chien inconnu, mort le 20 mars à l'hôpital Tenon.

Son bulbe, remis à l'Institut Pasteur et inoculé à deux lapins le 21 mars, a donné la rage le 2 avril.

Leroux (Anatole), 13 ans, chez ses parents, rue Denfert-Rochereau, 17, à Saint-Denis.

Mordu à la figure le 8 avril, par un chien enragé ; pris de rage le 19 juin, mort à l'hôpital de Saint-Denis le 22 juin.

Bée (Michel), 40 ans, Choisy-le-Roi, mordu 9 mois avant par un chien errant : ne s'est plus préoccupé de sa morsure. Mort le 7 août 1900 à l'hôpital de la Pitié, de la rage, dit-on. Son bulbe, qui était en putréfaction quand on l'a remis à l'Institut Pasteur, le 15 août, a été inoculé à deux cobayes qui n'ont jamais donné de résultat.

Tissier (Auguste), 27 ans, chiffonnier, demeurant à Nanterre, aurait été mordu à la figure, nous dit-on, par un chien errant, six semaines avant ; mort à l'hôpital Beaujon le 9 septembre. Son bulbe inoculé le 15 septembre à un lapin a donné la rage le 3 octobre.

Goubert, 26 ans, demeurant 1, rue Jean-Jacques-Rousseau, à Paris, est mort le 12 septembre des suites de crises rabiformes. Nous n'avons pas eu d'autres renseignements.

Erratum. — A la page 593 de ce volume, dans la note au bas de la page lire M. Métalnikoff au lieu de M. Metchnikoff.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CAUSALE DES MODIFICATIONS D'ÉTAT DES COLLOIDES

SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

DE LA

MICELLE ALBUMINOÏDE

PAR LE Dr SWIGEL POSTERNAK[1]

X

MÉCANISME DE LA SOLUBILISATION DES COLLOÏDES

La question de la cause de la solubilisation des colloïdes, à l'encontre de celle de la précipitation, n'a jamais préoccupé les chimistes.

La seule hypothèse, tacitement admise par la plupart des représentants de la chimie biologique pour expliquer la solubilité des colloïdes d'origine vitale dans les acides et les alcalis, est d'ordre chimique. Les corps, solubles dans les acides, sont considérés comme de nature basique : les corps, solubles dans les alcalis, comme possédant un caractère acide. Une grande partie de la terminologie et des conceptions en cours dans la chimie des albuminoïdes fut certainement inspirée par cette hypothèse presque bizarre.

Quelle raison peut-on, en effet, invoquer en faveur de la dénomination « acide nucléique[2] » ou « acide mélanoïdique[3] », si ce n'est la solubilité de ces deux corps dans les alcalis et l'insolubilité de l'un d'eux dans l'alcool acidulé, de l'autre dans les

1. Suite. Voir les nos de février et de mars de ces *Annales*.
Plusieurs *errata* ont échappé à la correction. En voici les plus importants :
Page 108, ligne 11 au lieu de *plus grand*, lire *moins grand*.
— 113, — 6 — à 1/2 0/0 — à 1/2 0/0 dans HCl à 1/2 0/00.
Même page, — 19 après *des ions* ajouter dans 2 c. c.
Page 173, tableau VI, ligne 1, au lieu de 63, lire 634.
Même tableau, ligne 2, au lieu de 0,0551 lire 0,00551.
Page 200, note 1, au lieu de *cathode* lire *anode* et inversement.

2. R. ALTMANN, Ueber Nucleïnsäuren, *Arch. f. Anatomie und Physiologie*. (Phys. Abt.), 1889, p. 524.

3. O. SCHMIEDEBERG, *Arch. f. experimentale Path. u. Pharmacol*, t. XXXIX, p. 1.

acides concentrés. Quel argument peut-on apporter en faveur de la conception de la nucléohistone qui ne serait, d'après M. Lilienfeld, qu'un nucléate double d'albumine et d'histone, en dehors de la possibilité de décomposer le précipité que l'on obtient à l'aide de l'acide acétique dans les extraits aqueux des cellules, en deux fractions, dont l'une est soluble dans l'acide chlorhydrique à 0,8 0/0 (histone), l'autre insoluble (nucléine)?

L'enchaînement des idées qui a amené à cette hypothèse n'est pas difficile à deviner. On transporte dans le domaine des albuminoïdes et de la chimie cellulaire quelques constatations superficielles de la chimie minérale, en les généralisant hâtivement.

En traitant un sel métallique avec un alcali, on précipite la base métallique qui peut être redissoute à l'aide d'un peu d'acide. On en conclut que les bases, en général, sont insolubles dans les alcalis et solubles dans un milieu acide. Or, sans même invoquer la solubilité mutuelle des acides minéraux ou des alcalis, ou l'insolubilité des phosphates acides dans les alcalis, il est absolument inexact d'affirmer que les bases métalliques sont insolubles dans ces derniers réactifs. Les précipités des hydrates qu'on observe généralement n'apparaissent que parce qu'en même temps qu'eux il se forme un sel alcalin qui précipite l'hydrate métallique de ses solutions colloïdales[1]. Et comme cette précipitation demande toujours une concentration assez grande et définie des substances minérales, on peut, par dilution du sel métallique avec beaucoup d'eau, empêcher la formation du précipité. C'est cette propriété qui a permis, par exemple, à MM. Brédig et Müller V. Berneck[2] d'étudier l'action catalytique des hydrates de manganèse, de cobalt, de nickel, de cuivre, de plomb et de fer en solution alcaline sur l'eau oxygénée. Ces solutions ont été obtenues avec une concentration moléculaire des sels égale tout au plus à 0,0001 en présence d'un excès de soude. Enfin, l'hydrate d'aluminium est assez soluble dans les alcalis.

Il est difficile, par conséquent, de tirer une conclusion quelconque au sujet du caractère chimique d'un corps d'après la

1. Il est vrai, qu'une fois formé, le précipité bien lavé n'est plus soluble dans les alcalis. Mais alors intervient un phénomène dont l'étude sera plus en place au chapitre consacré à la coagulation.

2 *Z. f. physik. Ch.* T. XXXI, p. 258 (1899).

nature des réactifs dans lesquels il est soluble ou insoluble. La plupart des matières colloïdes connues, à l'exception de celles qui possèdent des micelles extrêmement grandes, sont solubles à la fois dans les alcalis et les acides de faible concentration [1]. La solubilité plus ou moins grande des colloïdes ne dépend que des propriétés physiques de leurs micelles. C'est ce que nous essayerons de démontrer.

Au point de vue de leur solubilité dans l'eau, les colloïdes peuvent être divisés en deux groupes : 1° les colloïdes qui s'y dissolvent sans qu'on se trouve obligé d'ajouter quoi que ce soit pour favoriser la dissolution : 2° les colloïdes insolubles dans l'eau distillée.

Il est impossible de ne pas être frappé par cette constatation que toutes les matières appartenant au premier groupe — les albumines exceptées, on verra plus loin pourquoi — les albumoses, les peptones, les dextrines, le glycogène, le tannin, l'acide tungstique, etc., ont donné, en règle générale, à l'étude cryoscopique des nombres au-dessous de 5.000, du moins selon les mesures effectuées jusqu'ici. Les corps appartenant au deuxième groupe ont mené à des nombres beaucoup plus forts.

Toutes les réserves faites sur l'exactitude des chiffres obtenus pour les colloïdes par les méthodes physico-chimiques, ils peuvent cependant servir pour la comparaison du poids des particules formées par la dissociation de ces matières dans l'eau, des micelles, par conséquent, si l'on se rappelle notre définition des colloïdes. En outre, comme on n'a pas de raison d'admettre une variabilité très grande de la densité des micelles de différente origine, placées dans les mêmes conditions, ces nombres peuvent nous renseigner aussi sur la grosseur relative de ces unités physiques.

Nous voyons donc que tous les colloïdes solubles dans l'eau distillée présentent une grosseur micellaire ne dépassant pas une certaine limite. Il est naturel dès lors de penser que si l'on arrivait par un moyen quelconque à diminuer au-dessous de

1. C'est aussi le cas, de l'acide mélanoïdique qui est même un peu soluble dans les acides concentrés. Si l'on décompose un albuminoïde à chaud avec de l'acide sulfurique à 30 0/0, le liquide devient brun foncé. En neutralisant exactement dans le liquide filtré l'acide sulfurique avec de la soude et en acidifiant légèrement avec de l'acide acétique, on obtient un précipité assez notable de la substance mélanoïdique qui était, par conséquent, en solution, malgré la présence de l'acide sulfurique assez concentré.

cette limite la grosseur des micelles appartenant aux colloïdes du deuxième groupe, tout en ne changeant rien à leur poids ou au nombre des molécules qui les composent, on parviendrait par cela même à les mettre en solution.

Or, on a vu au chapitre précédent que les ions libres possèdent la faculté de diminuer la grosseur des micelles en leur communiquant une charge électrique plus ou moins notable. D'autre part, nous avons été amenés depuis longtemps à reconnaître aux ions une action solubilisante sur les micelles albuminoïdes. Ces notions sont à rapprocher.

La cause et le mécanisme de la solubilisation d'un colloïde insoluble dans l'eau distillée est la diminution de la grosseur de ses micelles sous l'influence de la charge électrique qui leur est communiquée par les ions libres.

Un examen rapide des constatations empiriques sur la solubilisation des colloïdes dans l'eau entraînera, j'espère, la conviction du lecteur.

Les faits que nous nous proposons de passer en revue peuvent être divisés en trois catégories : 1° les faits qui se rapportent aux méthodes de préparation des hydrosols ; 2° les faits qui prouvent l'existence d'une relation entre les pouvoirs électrisant et solubilisant d'un électrolyte ; et 3° les faits qui démontrent directement la modification réelle de la grosseur micellaire.

Méthodes de preparation des solutions colloïdes. — En premier lieu sont à rappeler celles que Graham (*Phil. Transact.*, t. CLI, page v. 183-1861) a proposées pour la solubilisation de l'hydrate d'aluminium, de l'hydrate de fer et de la silice.

On sature une solution étendue d'acide chlorhydrique avec de l'hydrate d'aluminium fraîchement préparé, et on soumet le tout à la dialyse jusqu'à ce que liquide extérieur ne permet plus de déceler l'acide chlorhydrique par le nitrate d'argent : Mais « les chlorures ne sont pas les réactifs les plus sensibles, pour l'argent », et la solution de l'hydrate d'aluminium dialysée n'en contient pas moins encore de l'acide chlorhydrique très dilué qui suffit pour rapetisser les micelles de l'hydrate. Ce dernier, précipité de ses solutions, contient, d'ailleurs, une quantité sensible d'acide chlorhydrique. *Si l'on arrivait même à éloigner tout l'acide par une dialyse très prolongée, la charge électrique*

dont les micelles sont déjà porteurs persisterait néanmoins pendant assez longtemps, et tiendrait l'hydrate en solution, à condition que rien ne vienne le décharger.

Pour obtenir l'hydrate ferrique colloïdal, on sature une solution de perchlorure de ce métal avec de l'hydrate de fer fraîchement préparé et on dialyse. Le perchlorure de fer étant en partie hydrolysé, c'est encore l'acide chlorhydrique provenant de l'hydrolyse qui communique aux micelles la charge électrique nécessaire à leur diminution.

On prépare l'hydrosol de la silice, en versant, d'après le conseil de Graham, une solution alcaline de silice dans un excès d'acide chlorhydrique et on dialyse. Si l'on avait neutralisé exactement la solution alcaline avec de l'acide chlorhydrique, on aurait obtenu un précipité de silice gélatineuse, tout comme on provoquerait une précipitation dans les mêmes conditions avec une solution alcaline d'un albuminoïde de réserve. Dans l'acte de neutralisation, les ions à pouvoir électrisant le plus notable $\overset{+}{H}$ et $\overset{-}{OH}$, qui ne peuvent pas exister côte à côte dans une solution aqueuse, s'unissent en formant de l'eau. Il ne reste que les ions moins actifs des sels alcalins, qui ne suffisent pas pour dissoudre les micelles de la silice.

M. H. Schulze [1] obtint les sulfures d'arsenic et d'antimoine en solution aqueuse en traitant l'anhydride arsénieux et le sulfure d'antimoine suspendus dans l'eau par l'hydrogène sulfuré. M. Spring [2] prépara par la même méthode les sulfures de cuivre et d'étain, M. Prost [3], le sulfure de cadmium, M. Winssinger [4], les sulfures de mercure, de zinc, d'or, de platine, d'argent, de palladium etc. Dans tous ces cas ce sont les ions libres de l'acide sulfhydrique qui agissaient comme solubilisateurs, en communiquant naturellement aux micelles une charge positive.

Les méthodes, proposées pour la préparation des solutions colloïdes des *métaux*, semblent au premier abord beaucoup plus compliquées, et quelques-unes d'entre elles rappellent par leur empirisme dogmatique les recettes médicales du moyen

1. *J. f. praktische Chemie*, 1882, p. 431; 1883, p. 320.
2. *Ber. d. d. Chem. ges.*, 1883, p. 1142.
3. *Bull. de l'Ac. Royale de Belgique*, sér. 3, t. XIV; 1887, p. 312.
4. *Bull. de la Soc. Chimique de Paris*, t. XLIX, 1888, p. 432.

âge. Et cependant, le mécanisme de la solubilisation des métaux est le même que pour d'autres colloïdes. Toute la complexité des méthodes proposées est due à la nécessité de permettre le contact des ions libres avec les unités physiques du métal.

Ce dernier, à l'état compact et malléable, comme nous le voyons autour de nous, est encore moins soluble en présence des acides de faible concentration ou des alcalis qu'un albuminoïde corné qu'on obtient par dessiccation lente d'une solution de matière protéique sur l'acide sulfurique. Le même albuminoïde, finement pulvérisé et trituré avec un alcali ou un acide faible, entre facilement en solution. Les métaux tels que l'or, l'argent, le platine peuvent, comme on sait, être mis en état de division extrême par réduction des solutions de leurs sels. Or, si les ions interviennent pendant la réduction, les micelles surprises au moment même de leur formation au dépens du sel, sont électrisées et diminuées de volume.

Dans la méthode de M. Schottländer [1], c'est évidemment l'acétate céreux qui agissait en réducteur et la soude qui fournissait les ions solubilisateurs. Mais la réduction chimique des métaux précieux peut être atteinte par d'autres moyens que l'acétate céreux, par les hydrates de carbone, par la plupart des sels d'oxydes inférieurs, par la formaldéhyde, par l'eau oxygénée, par l'hydrogène à la température de 100°, etc. Aussi voyons-nous M. Carey-Lea proposer tour à tour la dextrine et le citrate de fer pour préparer l'argent colloïdal. Cet auteur [2] fait dissoudre 40 grammes de dextrine avec autant de soude dans deux litres d'eau, et ajoute au mélange une solution de 28 grammes de nitrate d'argent. Le liquide devient noir foncé, rouge après dilution. Dans ce procédé, c'est l'excès de soude qui solubilise les micelles du métal réduit. En neutralisant exactement la soude, on précipite le métal.

1. D'après le procédé de M. Schottländer (*Ber. d. d. Chem. g.*, t. XXVII, p. 499 (1894), Referat.), on mélange 15,75 gr. d'acétate céreux en solution dans 300 c. c. d'eau distillée libre d'air et d'acide carbonique avec 400 c. c. de soude décinormale, et on y ajoute petit à petit 300 c. c. de chlorure d'or neutre, contenant 2 grammes d'or. On chauffe le tout au feu nu de une heure à une heure et demie et on obtient ainsi une solution violette très foncée d'or métallique qui peut être précipité par les sels alcalins. Malgré ces détails, aussi nombreux que précis, le précipité après purification contient 53,70 °/₀ d'or et 39,32 °/₀ d'oxyde de cerium.

2. *American Journal of Science*, S. 3, t. XLI, p. 482.

Le second procédé de M. Carey-Lea[1] consiste à mélanger le citrate de fer avec une solution de nitrate d'argent. On obtient un hydrosol d'argent analogue au précédent, avec cette différence que la solubilisation est due aux ions de l'acide citrique mis en liberté.

M. Zsigmondy[2] s'est servi de la formaldéhyde en présence du carbonate de potasse pour préparer l'or en solution colloïde. Le carbonate de potasse est en partie hydrolysé dans l'eau, ce sont donc les ions de la potasse qui communiquaient aux micelles une charge négative. Sous l'influence du courant électrique les particules d'or se déplaçaient, en effet, vers l'anode.

M. Stoeckl et Vanino[3] ont appliqué récemment toute une série de réducteurs, y compris le phosphore, employé jadis par Faraday, en présence ou en l'absence des alcalis, pour préparer l'or colloïdal. Mais la méthode la mieux faite pour la démonstration du mécanisme de la solubilisation des métaux est assurément celle de M. Muthmann[4]. Cet auteur, qui a le premier reconnu la nature colloïdale des solutions d'argent, a soumis le citrate d'argent cristallisé à l'action de l'hydrogène à 100 degrés. La réduction se poursuivait lentement, et au bout de quelques heures les cristaux sont devenus complètement noirs à cause de l'argent métallique réduit. Les particules d'argent, figées dans la masse organique où elles avaient pris naissance, n'ont pu se réunir en conglomérats très grands et inaccessibles à la solubilisation. Cette masse noire était facilement soluble dans l'ammoniaque. Ici encore, ce sont les ions de ce dernier électrolyte qui sont intervenus comme solubilisateurs.

On connaît, cependant, à l'heure actuelle, une méthode de solubilisation des métaux, où les ions ne jouent certainement aucun rôle, puisque tout le processus se fait en leur absence. Je parle du procédé très élégant, imaginé par M. Bredig[5] et qui consiste, en deux mots, en la production d'un arc lumineux, au-dessous de la surface d'eau distillée, entre deux électrodes formées par des fils de 1 mm. de diamètre du métal qu'on cherche à

1. *Ibidem*, Ser. 3, t. XXXVII, p. 476; t. XXXVIII, p. 47.
2. *Liebig's Annalen*, t. 301, p. 29.
3. *Loc. cit.*, p. 98.
4. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, 1887, t. XX, p. 983.
5. *Zeitschrift f. angewandte Chemie*, 1898, p. 953.

solubiliser. Les particules du métal se détachent dans ces conditions de la cathode par un mécanisme encore peu élucidé (*Kathodenzerstaubung*). Comme la résistance au mouvement de ces particules dans l'eau est très grande, elles ne viennent pas s'accumuler sur l'anode, au fur et à mesure de leur détachement, ou s'agglomérer pour donner un dépôt du noir de métal, mais restent en solution dans l'eau distillée.

Or, il ne faut pas oublier que les particules détachées portent *une charge électrique négative*[1], c'est elle qui diminue la grosseur des micelles métalliques dans le procédé de M. Bredig, qui par cela même non seulement ne présente pas d'exception à la règle de solubilisation des colloïdes, mais apporte, au contraire, une preuve directe de ce que les ions n'agissent comme solubilisateurs que grâce à leur pouvoir électrisant.

Rapport entre le pouvoir électrisant et l'énergie solubilisante des électrolytes. Colloïdes à micelles diélectriques. — Comme l'acte de solubilisation consiste à ramener la grosseur des micelles au-dessous de la limite de leur solubilité dans l'eau distillée, il est à prévoir que l'énergie de l'agent solubilisant, nécessaire pour dissoudre un colloïde, sera en raison directe de la grosseur et en raison inverse de l'élasticité de ses unités physiques.

Il serait facile, en s'appuyant sur les notions du pouvoir électrisant des ions et des électrolytes développées au chapitre précédent, de composer toute une échelle de réactifs à action solubilisante croissante. Nous nous bornerons à disposer, dans l'ordre de leur efficacité, les dissolvants les plus employés par les auteurs[2].

Pour les micelles non conductrices, en général, et les albuminoïdes, en particulier, les dissolvants les plus faibles seront représentés par les solutions des sels alcalins. Le chlorure d'ammonium possède par exemple un pouvoir électrisant égal à 15,3, le chlorure de sodium à 38,7. Ensuite vient l'acide chlorhydrique avec un pouvoir électrisant à 46,5, enfin, les

1. Comp. Nahrwold, *Wied. Annalem.* N. F. t. XXX, 1888, p. 107. Lenard et Wolf. *Ibid.* t. XXXV, 1889, p. 443. Comme il fallait s'y attendre, les particules dans les solutions colloïdes d'or préparées par M. Bredig se déplaçaient vers l'anode lorsqu'on faisait passer un courant électrique à travers ces solutions.

2. Nous aurons toujours en vue des solutions diluées des réactifs, pour ne pas compliquer les phénomènes de dissolution par la présence des molécules non dissociées.

alcalis avec un pouvoir électrisant 56.6 pour l'ammoniaque et 80.0 pour la soude.

Si notre idée sur le mécanisme de la solubilisation des colloïdes est exacte, il est à prévoir que tous les albuminoïdes solubles dans les sels alcalins, le seront également dans l'acide chlorhydrique et les alcalis: les albuminoïdes solubles dans l'acide chlorhydrique le seront nécessairement dans les alcalis, sans qu'on ait besoin d'invoquer le caractère double d'acidité et de basicité qu'on attribue généralement aux matières albuminoïdes. L'inverse ne devait pas avoir lieu. C'est ce qu'on observe, en effet.

Le précipité, provoqué par l'acide oxyméthylénphosphorique dans les solutions bien dialysées de peptone de Witte, et contenant beaucoup de phosphore [1], dépasse par la grosseur de ses micelles la limite dont nous parlions plus haut, puisqu'il est insoluble dans l'eau; mais il ne la dépasse pas de beaucoup : les sels alcalins de concentration très faible le dissolvent facilement. Il est aussi soluble dans les acides et les alcalis.

Le précipité, que l'on obtient en dialysant le blanc d'œuf ou le sérum sanguin à froid, et que l'on désigne ordinairement sous le nom de globuline, est soluble dans les solutions physiologiques de sels alcalins. Toutes les globulines peuvent être solubilisées, comme on sait, par les acides de faible concentration et les alcalis.

Les caséines, certains albuminoïdes de réserve d'origine végétale, le blanc d'œuf dilué et chauffé, les histones, etc., sont solubles dans les acides de faible concentration, ils sont insolubles dans les sels alcalins, mais très solubles dans les alcalis. Sous l'influence de ces derniers réactifs à action très énergique, les micelles de quelques-uns des albuminoïdes précités diminuent tellement de grosseur, qu'il est impossible de les précipiter par nos réactifs, ce qui réussit parfaitement bien avec l'acide chlorhydrique qui diminue moins les unités physiques.

Enfin, les nucléines, dont les micelles sont constituées par un ou plusieurs groupements nucléique et un ou plusieurs groupements albuminoïdes — ce qui ne veut pas encore dire qu'on soit en présence d'un nucléate d'albuminoïde — ne peuvent être mises en solution que par les alcalis, et ceci, non parce que

1. S. Posternak, *l. c.*, p. 5.

les nucléines posséderaient une nature acide, supposition nullement démontrée malgré ce qu'on a pu écrire là-dessus, mais parce que les micelles trop grandes de ces matières, ne peuvent être ramenés à la grosseur au-dessous de la limite de solubilité que par un agent très puissant.

Colloïdes à micelles conductrices. — L'ordre dans lequel sont disposés nos réactifs ne sera pas le même en présence des micelles conductrices. Le pouvoir électrisant le plus faible appartiendra alors, comme dans le cas précédent, aux sels alcalins (chlorure d'ammonium, 0,6; chlorure de sodium, 6,8); ensuite viendront non les acides minéraux, mais les alcalis avec 30,5 pour l'ammoniaque et 40,7 pour la soude. Enfin, l'acide chlorhydrique avec un pouvoir électrisant 79,2.

On peut donc espérer de rencontrer des colloïdes conducteurs d'électricité : (*a*) solubles dans les acides et insolubles dans les alcalis et les sels alcalins; (*b*) solubles dans les alcalis et les acides et insolubles dans les sels alcalins et (*c*) solubles dans les trois groupes de réactifs.

La diminution de la grosseur micellaire la plus notable sera produite évidemment par les acides, c'est donc avec un excès de ces réactifs qu'on arrivera à ne pas obtenir des précipités dans les cas où il s'agira des colloïdes ayant, dès leur origine, des micelles de petite dimension.

Bien plus. Le pouvoir électrisant des ions haloïdes étant presque identique vis-à-vis d'une micelle conductrice (Cl = 20,8, Br = 21,0, J = 21,0), il est à prévoir que les chlorures, les bromures et les iodures provoqueront des précipités, presque à la même concentration moléculaire. A l'aide de ce signe il serait possible de reconnaître un colloïde conducteur d'électricité, même s'il nous était difficile de le prédire en s'appuyant sur sa constitution chimique.

Voici un exemple. Les micelles des métaux sont conductrices d'électricité, il ne peut pas avoir de doute là-dessus. Mais les micelles des hydrates ou des sulfures métalliques, doit-on les classer parmi les conducteurs ou non conducteurs?

La réponse sera facile pour les hydrates de métaux, si l'on se rappelle les nombres trouvés par M. Hofmeister dans l'étude des concentrations précipitantes de l'hydrate de fer, et que nous avons cités plus haut (p. 171, note 1).

Pour les chlorures, cette concentration était de 0,63 en moyenne; pour les bromures, 0,67 ; pour les iodures, 0,65 ; valeurs presque identiques.

MM. Linder et Picton [1] sont arrivés à des résultats analogues pour le sulfure d'arsenic.

	Cl	Br	I
NH^4.....	1,010	1,200	1,200
K.....	1,590	1,640	1,660
Na.....	1,680	1,770	1,930

Ces nombres n'indiquent pas les concentrations précipitantes, mais ce que les auteurs précités désignent sous le nom de pouvoir coagulant relatif des sels, c'est-à-dire les nombres de gr. molécules de sels qui produiraient le même effet précipitant qu'un gr. molécule de chlorure d'aluminium. La façon est peu recommandable de présenter les résultats des expériences de précipitation, l'erreur de la méthode étant augmenté au moins deux cents fois. Néanmoins, les nombres pour les sels d'ammoniaque et de potasse des trois halogènes sont presque les mêmes.

Nous pouvons donc regarder les hydrates et les sulfures des métaux comme bons conducteurs d'électricité, et leur appliquer le second schéma de l'action solubilisante des réactifs. En effet, toutes les observations sur la précipitation des hydrates et des sulfures, accumulées avec beaucoup de soins par la chimie analytique, et utilisées par elle à la séparation et l'isolement des métaux. concordent très bien avec ce schéma.

Les sels alcalins possèdent un pouvoir électrisant trop faible, pour qu'il soit possible de préparer des solutions des colloïdes conducteurs à l'aide de ces dissolvants. Cependant, M. Carey Lea décrit un précipité d'argent colloïdal, qui était soluble dans le borate de soude et les sulfates alcalins. L'argent colloïde est aussi soluble. comme le demande notre schéma, dans les alcalis et les acides.

Nous avons vu que les hydrates de la plupart des métaux sont solubles dans les alcalis faibles, l'hydrate d'aluminium même dans les alcalis plus concentrés, les hydrates de tous les métaux sont également solubles dans les acides.

Les sulfures de fer, de manganèse, de zinc, de nickel et de cobalt sont peu ou pas solubles dans les alcalis et l'ammoniaque, ils sont mieux solubles dans les acides. Car, tandis qu'il est

1. *J. of the Chemic. Society*, t. LXVII, p. 63. 1895.

impossible de précipiter ces combinaisons de leurs solutions acides par un excès d'acide minéral et les sels, on les insolubilise, d'après les règles de la chimie analytique, en milieu alcalin par le chlorure d'ammonium. Les conditions indispensables pour la séparation de ce groupe de métaux sont, en effet, la précipitation avec le sulfure d'ammonium dans un milieu non acide en présence du chlorure d'ammonium [1].

Le sulfure de zinc, toutefois, dont les micelles semblent être un peu plus grandes, peut être précipité aussi en milieu acide, mais seulement à la condition que le nombre des ions libres ne soit pas trop fort, en présence des acides organiques, par conséquent. Ce cas est, comme on voit, tout à fait analogue à celui des albuminoïdes de Picea excelsa qui, grâce à leur grosseur micellaire, ont pu être précipités par nos réactifs en milieu alcalin (concentration moléculaire 0,0273), lorsque nous avons remplacé la soude par l'ammoniaque.

Les sulfures d'argent, de mercure, de plomb, de bismuth, etc., sont presque insolubles dans les alcalis *et facilement solubles dans les acides de faible concentration*, sur quoi nous avons vu basée la méthode de préparation de leurs solutions colloïdales. Ces solutions sont facilement précipitables par un excès d'acide ou de sel. C'est cette faculté qu'on utilise en chimie analytique pour séparer le quatrième groupe de métaux du troisième. La recommandation de diluer avec de l'eau les solutions des sels métalliques, lorsqu'il y a une concentration trop grande d'acide minéral en présence, avant d'entreprendre la précipitation avec l'hydrogène sulfuré, n'est pas en contradiction avec notre manière de concevoir cette opération. Les acides concentrés décomposent en partie les sulfures formés en les transformant en des sels minéraux correspondants. Le quatrième groupe de métaux semble donner des sulfures à micelles beaucoup plus grandes que les sulfures des métaux du troisième groupe.

L'ensemble de ces faits indique suffisamment l'existence réelle du rapport entre le pouvoir électrisant des électrolytes et leur énergie solubilisante.

1. Les sulfures de nickel et de cobalt, une fois précipités, ne se dissolvent plus dans les acides faibles et ne peuvent être facilement attaqués que par l'eau régale. C'est encore un exemple de coagulation, analogue à celui que nous avons constaté précédemment pour les hydrates et auquel nous reviendrons plus loin.

***

Démonstration directe de la variation de la grosseur micellaire. — Mais faut-il admettre encore la diminution de la grosseur micellaire sous l'influence de la charge électrique, et ne suffit-il pas, pour expliquer les phénomènes de solubilisation, de faire intervenir la répulsion entre les micelles, électrisées dans le même sens, qui empêcherait leur agglomération en flocons ou en coagulums ?

Cette répulsion joue peut-être un rôle dans les phénomènes étudiés par nous : il n'en est pas moins certain qu'à elle seule elle n'est pas capable d'expliquer tous les faits observés, notamment la précipitation sous l'influence des molécules non dissociées, qui sont neutres et ne peuvent pas influencer la charge électrique des micelles.

Les observations qui démontrent d'une façon presque directe la modification de la grosseur micellaire méritent d'autant plus d'intérêt.

MM. Linder et Picton [1], en cherchant à se faire une idée sur l'état des particules dans les solutions colloïdes, ont systématiquement appliqué aux différents colloïdes placés dans des conditions variées l'étude à l'aide des moyens optiques, tels que la microscopie, la spectroscopie, la réaction de Tyndall, ainsi que la filtration à travers une paroi poreuse et la diffusion.

Tous ces essais n'ont pas, évidemment, la même valeur. Les particules en question sont trop petites pour qu'on puisse espérer de les saisir même avec les grossissements que nous possédons aujourd'hui. Si, dans le cas de sulfure de mercure et de sulfure arsenical α, les auteurs sont arrivés, au bout de quelque temps d'observation, à voir un certain nombre de granulations en mouvement brownien, il faudrait peut-être l'attribuer à l'évaporation de la goutte, à l'élévation consécutive de la concentration des matières minérales accompagnant ces colloïdes et au commencement d'agglomération micellaire.

La spectroscopie, comme l'a montré déjà, en 1888, M. Winssinger [2], ne fait pas ressortir des différences bien nettes entre les colloïdes variés. L'obscurcissement du spectre s'étend toujours sur les bandes violettes et bleues.

1. *The Journal of the Chem. Society*, t. LXI, p. 148, 1892.
2. *Loc. cit.*, p. 455.

Le phénomène de Tyndall et les essais de filtration ont donné des résultats plus curieux.

Une solution de silice, préparée d'après Graham, bien dialysée et laissée reposer pendant quatre jours, donnait très nettement la réaction de Tyndall et ne passait pas à travers une paroi poreuse. La même solution, acidifiée légèrement avec de l'acide chlorhydrique, filtrait parfaitement bien et ne dispersait plus la lumière dans le tube de Tyndall. Les micelles de la silice s'étaient évidemment contractées dans ce dernier cas sous l'influence d'une nouvelle quantité d'ions, apportés avec l'acide chlorhydrique, puisqu'elles ont perdu la faculté de disperser et de polariser la lumière, faculté qui n'appartient qu'aux particules assez grosses.

Le rouge du Congo donnait la réaction de Tyndall lorsque la solution était neutre ou acide, les solutions alcalines se comportaient à cette épreuve comme l'eau distillée. Ici la diminution de la grosseur micellaire, suffisante pour empêcher la dispersion de la lumière, n'a pu être atteinte que par les alcalis — agents solubilisants les plus énergiques vis-à-vis de la micelle non conductrice. Avec le rapetissement de la micelle était lié aussi la faculté de passer à travers une bougie de porcelaine.

MM. Linder et Picton concluent également à la diminution de la grosseur des particules, mais ils semblent admettre une dissociation plus grande de la matière, qui se rapprocherait d'une solution véritable. Mais il serait nécessaire alors d'expliquer pourquoi le même effet est produit dans un cas par l'acide chlorhydrique, dans l'autre par les alcalis; pourquoi la dislocation de la micelle, une fois commencée, ne va pas jusqu'à donner des solutions facilement diffusibles dans l'eau, ce qui n'a pas été observé par les auteurs, même dans le cas du sulfure d'arsenic ♂, qui se rapprocherait le plus, d'après eux, d'une vraie solution; pourquoi les fragments micellaires se réunissent-ils de nouveau, lorsqu'on change la réaction du milieu ou lorsqu'on ajoute une petite quantité de chlorure de sodium, pour permettre la réapparition du phénomène de Tyndall ou empêcher le passage à travers une paroi poreuse (c'est ce que les auteurs appellent « degradation [1]»). Si le commencement d'agglomération du colloïde est seul à amener la formation

1. *The J. of the Chem. Soc.*, t. LXVII, p 73, 1895.

du précipité, pourquoi la solution « dégradée » peut-elle rester limpide indéfiniment ?

Une autre preuve de la faculté des micelles colloïdes de modifier leur grosseur nous est apportée par MM. Stockl et Vanino. Ces auteurs, que nous avons cités déjà maintes fois, ont soumis à la discussion les valeurs des coefficients de réfraction et les indices d'extinction de différents rayons, composant la lumière blanche, par rapport à l'or, et sont arrivés à la conclusion qu'une solution colloïdale de ce métal nous apparaîtra d'un rouge rubis, lorsque les particules d'or en suspension seront très petites; elle prendra une coloration violette ou bleu avec l'augmentation de la grosseur de ces particules.

Or, dans une série de 31 solutions d'or, préparées à l'aide de différents réducteurs, presque toutes les solutions qui contenaient de la potasse présentaient une coloration bleue ou violette, celles où la solubilisation du colloïde était effectuée par l'acide chlorhydrique mis en liberté, étaient colorées en rouge. Les micelles étaient donc plus grandes dans les solutions alcalines que dans les solutions acides.

L'explication de ce phénomène est très facile, lorsqu'on se rappelle que l'acide chlorhydrique possède un pouvoir électrisant beaucoup plus grand que la potasse, vis-à-vis des micelles conductrices, et les diminue, par conséquent, plus fortement.

On voit donc que la conception de solubilisation par diminution de la grosseur des micelles, sous l'influence de la charge électrique qui leur est communiquée par les ions ou même directement, nous permet d'envisager à un point de vue général tous les phénomènes de passage de l'état solide à l'état de dissolution observés chez les colloïdes et d'expliquer la plupart des faits qui s'y rattachent. Nous allons montrer maintenant qu'elle peut être utile aussi pour nous guider dans l'étude des cas plus compliqués.

Blanc d'œuf. Albuminase. — Revenons au blanc d'œuf et demandons-nous à quoi est due la solubilisation de l'albuminoïde qui y est contenu, qui peut en être isolé par les différentes méthodes indiquées plus haut, et dont les micelles sont trop grandes pour être solubles dans l'eau distillée.

Le blanc d'œuf a une réaction franchement alcaline. On peut, par conséquent, admettre qu'il contient des ions $\overline{OH}$ dont le

pouvoir solubilisant très énergique pour les micelles non conductrices nous est bien connu. Est-ce le seul agent solubilisant en présence? Rien de plus facile que de s'en assurer. Diluons le blanc d'œuf avec quelques volumes d'eau et neutralisons-le exactement à l'aide d'un acide pour éliminer l'action des ions très énergiques ($\overline{OH}$ et $\overset{+}{H}$). Si l'hydroxyle était le seul agent solubilisant dans le blanc d'œuf, on devrait obtenir un précipité à la neutralisation, l'albuminoïde en question étant insoluble dans les solutions faibles de sels alcalins. Le liquide reste cependant sans altération. Il est évident que le blanc d'œuf contient, outre les hydroxyles, encore un autre agent capable de diminuer la grosseur des micelles albuminoïdes.

Cet agent est entraîné par le sulfate d'ammonium lorsqu'on sature le blanc d'œuf, afin de précipiter ce qu'on appelle ordinairement albumine d'œuf; il entre même dans la constitution des cristaux d'albumine, préparées par la méthode de Hofmeister, puisque ces cristaux, comme le précipité obtenu à l'aide du sulfate d'ammonium, se redissolvent dans l'eau comme le blanc d'œuf initial. Cet agent est détruit par la chaleur, car il suffit de chauffer le blanc d'œuf dilué et neutralisé jusqu'à 70 degrés pour obtenir le précipité qui a tardé à apparaître.

On ne manquerait pas d'attribuer la formation du précipité à la coagulation de l'albumine d'œuf sous l'influence de la chaleur; ne nous laissons pas influencer par les idées courantes qui seront analysées et mises au point un peu plus loin. On peut, d'ailleurs, comme nous le savons déjà, détruire l'agent en question sans provoquer la coagulation, en chauffant le blanc d'œuf dilué directement ou après neutralisation avec un excès d'acide. Après refroidissement, la neutralisation exacte nous fournira un précipité d'albuminoïde libéré de l'agent qui diminuait ses micelles.

Cet agent peut être affaibli ou même détruit *à froid* par un contact prolongé avec de l'alcool, avec de l'éther ou avec de l'eau acidulée. Il est facile de démontrer que plus grande est la quantité d'eau acidulée par rapport au blanc d'œuf, plus rapidement progresse l'altération de l'agent dissolvant. Son affaiblissement doit se manifester naturellement par un agrandissement des micelles albuminoïdes, et comme la grosseur des micelles est en raison inverse de la quantité du sel qu'il faut pour les

précipiter, nous possédons un moyen de nous rendre compte de l'état de l'agent dont il est question.

Le blanc d'œuf, dilué fraîchement avec de l'acide chlorhydrique très faible, ne peut pas être précipité par aucun des réactifs de la concentration adoptée pour nos expériences. Si l'on place deux portions égales du même blanc d'œuf, diluées respectivement avec 4 et 11,5 volumes d'acide chlorhydrique à 1,1 p. m., dans des conditions absolument identiques (à la température de 8 à 10°), on constate au bout de cinq jours que les deux portions ont acquis la faculté de précipiter, mais d'une

TABLEAU XIV

Blanc d'œuf dilué avec 4 vol. HCl à 1,1 ‰ à froid (5 jours) 2 c. c.						Dilué avec 11,5 vol. HCl à 1,1 ‰ à froid (5 jours) 2 c. c.		
			De 8 à 10°			De 8 à 10°		
C.R.	RÉACTIF	P.M.	V.R.	C %	C.M.	V.R.	C %	C.M.
20 %	NH_4Cl	53,52	∞	∞	∞	0,86	6,00	**1,120**
—	NaCl	58,5	1,9	9,70	**1,660**	0,50	4,00	**0,684**
—	KCl	74,59	∞	∞	∞	1,06	6,70	**0,898**
10 %	NH_4Br	98,03	∞	∞	∞	2,04	5,00	**0,510**
—	NaBr	103,01	∞	∞	∞	1,40	4,12	**0,400**
—	HNO_3	63,048	0,38	1,60	**0,259**	0,40	1,66	**0,263**
—	NH_4NO_3	80,11	2,1	6,80	**0,848**	0,55	2,16	**0,270**
—	KNO_3	101,18	∞	∞	∞	0,96	3,26	**0,322**
10 %	$\frac{1}{2}(NH_4)_2SO_4$	66,1	∞	∞	∞	∞	∞	∞
8 %	$\frac{1}{2}Na_2SO_4$	71,08	∞	∞	∞	∞	∞	∞

façon inégale, comme il résulte du tableau XIV. La première, diluée avec moins d'acide, ne peut être précipitée que par trois de nos réactifs. Elle demande une concentration moléculaire de 1,66 pour le chlorure de sodium, de 0,848 pour le nitrate d'ammonium et de 0,259 pour l'acide nitrique. La deuxième portion, diluée avec 11,5 vol. de NaCl à 1,1 ‰, précipite sous l'influence de toute la série de nos réactifs, les sulfates exceptés. Les nombres sont tous

inférieurs à ceux observés avec la portion précédente, malgré la dilution plus grande de l'albuminoïde qui devrait provoquer un effet contraire, et supérieurs à ceux du tableau X, obtenus avec la même solution de blanc d'œuf chauffé préalablement. Pour l'acide nitrique, la concentration précipitante est à peu près la même dans les trois cas, ce qui semble plaider en faveur d'une énergie destructive très grande de cet acide vis-à-vis de l'agent solubilisant spécifique du blanc d'œuf.

L'interprétation rationnelle de ces faits serait impossible en dehors de notre conception. Le blanc d'œuf naturel présente des conditions où l'agent décoagulant se conserve le mieux. C'est lui qui, de concert avec les ions de l'alcali, diminue la grosseur des micelles albuminoïdes et les fait ressembler, au point de vue de la solubilité et de la difficulté de précipiter sous l'influence des sels, aux colloïdes à poids micellaire très faible. Au fur et à mesure de l'affaiblissement de l'agent, la grosseur micellaire augmente et avec elle la faculté de précipitation. Au bout de cinq jours dans notre expérience, où le blanc d'œuf fut dilué avec 11,5 volumes d'eau acidulée, les micelles albuminoides ont pris la grosseur correspondante aux nombres du tableau XIV, partie droite; avec quatre volumes d'acide à 1,1 0/00, l'affaiblissement de l'agent n'est pas allé aussi loin : la grosseur micellaire est restée plus petite : de là les concentrations précipitantes plus notables. En chauffant le blanc d'œuf au-dessus de 70 degrés, on détruit complètement l'agent solubilisant, on ramène l'albuminoïde à sa grosseur micellaire normale, et on n'a plus à compter qu'avec les modifications provoquées par les ions en présence. A ce moment-là nous sortons du domaine de la physiologie pour entrer dans celui de la physico-chimie.

Il est évident qu'au cours de l'affaiblissement progressif de l'agent décoagulant, il y aura une période où la grosseur micellaire d'une partie au moins d'albuminoïde en solution passera la limite de la solubilité des colloïdes dans l'eau, et restera dans la zone d'action des solutions physiologiques de sels alcalins. Si l'on vient à affaiblir graduellement notre agent en présence d'une solution saline trop faible pour tenir à l'état dissous toutes les micelles agrandies de l'albuminoïde, une partie de ce dernier sera précipitée et entraînera avec elle une portion de l'agent affaibli. L'albuminoïde précipité conservera, par conséquent,

sa solubilité dans les sels alcalins d'une concentration faible. C'est ce qu'on désigne sous le nom de *globuline* et ce qu'on obtient en dialysant le blanc d'œuf neutralisé, ou en le diluant avec une quantité considérable d'eau distillée, et en accélérant le processus par un courant d'acide carbonique.

Au point de vue quantitatif, le précipité sera plus ou moins grand suivant les conditions de sa production. Il sera toujours le même si l'on a soin d'opérer dans des conditions identiques.

Dissous dans un peu d'alcali, ou d'acide chauffé au-dessus de 70 degrés, il donnera des solutions tout à fait comparables à celles de l'albumine d'œuf soumise au même traitement.

Le précipité que l'on obtient en saturant le blanc d'œuf avec du sulfate de magnésie ou avec du sulfate d'ammonium à 35 0/0, contient encore des micelles très petites et complètement solubles dans l'eau. Ce n'est que pendant la dialyse qu'a lieu l'affaiblissement de l'agent solubilisant sous l'influence de l'eau et la précipitation d'une partie d'albuminoïde. C'est là l'origine de la conception de globuline soluble et insoluble, et l'explication des constatations analogues faites par MM. Burckhard, Heynsius, Marcus, dans l'étude du sérum sanguin.

Le fait qu'une partie seulement de l'albuminoïde du blanc d'œuf est précipitée par le sulfate de magnésie ou par le sulfate d'ammonium à demi saturé ne prouve nullement qu'il y ait une différence chimique entre les deux fractions de blanc d'œuf ainsi obtenues. Une solution de sulfate d'ammonium à 35 0 0 dissout moins d'albuminoïde que l'eau distillée, comme une solution aqueuse d'alcool dissout moins de sel marin que l'eau pure. En mélangeant une solution aqueuse de ce sel avec de l'alcool, une partie de chlorure de sodium sera précipitée. A qui viendra l'idée d'en conclure que le sel resté en solution diffère de celui qui est précipité, ou que le chlorure de sodium soit insoluble dans un mélange d'eau et d'alcool[1] ?

L'ovalbumine et l'ovoglobuline ne sont, par conséquent, que l'albuminoïde du blanc d'œuf à grand poids micellaire, insoluble dans l'eau et les solutions faibles de sels alcalins, soluble dans les acides de faible concentration et les alcalis, « dénaturé » par le même agent décoagulant d'une intensité différente, ce qui fait que dans un cas les micelles, étant diminuées au-dessous de la limite

1. Comp. E. Duclaux, ces *Annales*, t. VI, 1892, p. 369, 657.

de leur solubilité dans l'eau, prennent les propriétés physiques d'un colloïde à petit poids micellaire : dans l'autre cas, elles sont moins diminuées et se rapprochent par leurs propriétés de la combinaison des albumoses avec l'acide oxyméthylénphosphorique.

Prendre ces différences pour une base de la classification chimique des albuminoïdes est aussi peu rationnel que chercher à différencier chimiquement les huiles par la grosseur des particules de leur émulsion dans l'eau, émulsion obtenue par-dessus le marché dans des conditions très dissemblables.

Tout ce qui a été dit par nous à propos du blanc d'œuf est applicable au sérum sanguin. L'explication des expériences de MM. Corin, Bérard et Ansiaux ainsi que de celles de M. Starke est facile à saisir après les développements qui précèdent ; nous n'y insisterons pas.

Nous ne quitterons pas ce sujet avant d'avoir donné à l'agent décoagulant étudié précédemment, un nom qui résumerait l'ensemble des considérations et des faits qui s'y rattachent. Le lecteur a remarqué déjà que cet agent qui est précipité avec les albuminoïdes, qui est détruit par la chaleur et affaibli par le contact prolongé avec l'eau acidulée, avec l'alcool et l'éther, appartient à la famille des diastases, dans le groupe des diastases décoagulantes. Nous l'appellerons *albuminase*, diastase qui donne aux albuminoïdes à grand poids micellaire les propriétés physiques de l'albumine et de la globuline [1].

L'albuminase est, évidemment, un antagoniste de la présure qui doit, au contraire, augmenter la grosseur des micelles, puisqu'elle favorise la précipitation. A ce point de vue, il est intéressant de rappeler ici les travaux de M. Röden [2] et de M. Briot [3] qui ont démontré l'existence dans le sérum sanguin d'un ferment qui empêche l'action coagulante de la présure sur

1. L'albuminase agit-elle aussi en communiquant aux micelles ou en leur suscitant une charge électrostatique? Question difficile, sans doute, à résoudre *a priori*. Rien, en tout cas, ne s'oppose à l'admission de l'analogie entre le mécanisme de l'action solubilisante des ions et des diastases décoagulantes. Les phénomènes électriques sont, comme on sait, très répandus dans l'organisme et dans les tissus vivants. Spécialement, dans le relâchement des muscles contractés, phénomène de décoagulation physiologique par excellence, les nombreux auteurs qui se sont occupés de la question sont unanimes à reconnaître une augmentation du potentiel électrique dans la partie relâchée par rapport à la partie contractée.

2. *Maly's Jahresbericht*, t. XVII, p. 160, 1887.

3. *Comptes rendus*, t. CXXVIII, p. 1359, 1899.

le lait. C'est probablement le même qui « dénature » la matière protéique du sérum, en lui donnant les caractères de l'albumine et de la globuline.

Je le suppose, tout en connaissant le travail récent de MM. Fuld et Spiro[1] qui tend à démontrer que l'action antiprésurante n'appartient qu'à la pseudo-globuline, c'est-à-dire à la fraction correspondant à la globuline soluble de M. Marcus.

Pour expliquer l'inactivité de la fraction, dite d'albumine, vis-à-vis de la présure, il suffit d'admettre que l'albuminose n'y existe qu'à l'état d'adhésion aux micelles albuminoïdes, la diastase libre ayant été précipitée, en sa qualité de colloïde, par le sulfate d'ammonium qui a servi pour fractionner le sérum.

La même remarque se rapporte à l'observation de M. Seng[2], d'après laquelle l'action thérapeutique du sérum antidiphtérique serait liée exclusivement à la même pseudo-globuline. C'est à tort, à notre avis, que M. Marcus y voit une preuve décisive de la différence réelle entre la globuline soluble et insoluble dans l'eau.

XI

MÉCANISME DE LA PRÉCIPITATION DES COLLOIDES

Parallèlement à ce qu'on a vu pour les phénomènes de la solubilisation, il y a lieu d'envisager séparément la précipitation des colloïdes solubles et insolubles dans l'eau distillée.

Quant aux premiers, la modification de leur état sous l'influence des sels très concentrés, tout à fait analogue à la précipitation des substances minérales à l'aide de l'alcool, semble être inaccessible, à l'heure actuelle, à une explication raisonnée. Tout ce qu'on peut dire à ce sujet, c'est qu'en présence des sels, l'action dissociante de l'eau paraît s'affaiblir, ce qui favoriserait la réunion, l'agglomération des particules dissociées en flocons.

Tout autrement se présentent à nous les phénomènes de précipitation des colloïdes insolubles dans l'eau distillée, pour lesquels

1. *Ztsch. f. physiolog. Chemie*, t. XXXI, p. 132, 1900.
2. *Ztsch. f Hygiene und Infections Kr.*, t. XXXI, p. 513.

la force dissociante de ce dernier dissolvant est nulle dès l'origine et, par conséquent, au-dessous d'une diminution possible. La question à résoudre dans ce cas spécial est précise : par quel mécanisme peut-on arriver à rendre aux micelles, dont la grosseur était diminuée par les agents dissolvants que nous connaissons, leur volume primitif ou tout au moins une grosseur au-dessus du degré de leur solubilité dans l'eau?

Le mécanisme du *point de départ* des phénomènes de précipitation une fois connu, l'adhésion plus grande des micelles, revenues à leur grosseur initiale, entre elles qu'envers l'eau, suffira pour nous rendre compte de l'agglomération progressive du colloïde, qui se manifestera par l'apparition des particules visibles au microscope, d'un trouble visible à l'œil nu, des flocons et quelquefois du coagulum, suivant la conception de la continuité du processus la coagulation développée par M. Duclaux[1].

Les agents modifiant la grosseur micellaire étant d'ordre différent, il est évident que le mécanisme de la précipitation variera suivant la cause sous la dépendance de laquelle se trouveront les micelles colloïdes en solution.

Si elles sont diminuées par une diastase décoagulante, il suffira de chauffer la solution pour obtenir un précipité comme on l'a vu pour l'albuminoïde du blanc d'œuf dilué et exactement neutralisé. Le même effet pourra être provoqué par une diastase antagoniste (plasmase, coagulines, etc.).

Si l'acte de la solubilisation est provoqué par les ions, c'est en neutralisant la charge électrostatique des micelles que l'on arrivera au but poursuivi. C'est le mode de précipitation des colloïdes par neutralisation de leurs solutions acides à l'aide d'un alcali, et inversement, dont nous avons cité quelques exemples dans le chapitre précédent.

Mais lorsqu'on précipite une solution acide ou alcaline d'un colloïde en se servant des électrolytes neutres ou de nature chimique identique à celle de l'électrolyte dissolvant, non seulement on ne neutralise pas la charge électrostatique de la micelle, mais, au contraire, on l'augmente notablement. Comment se libère alors la micelle de l'action solubilisante de sa charge élec-

1. *Traité de Microbiologie*, t. II, chapitre XV.

trique? Les pages qui précèdent nous permettent de répondre à cette question.

On a vu, au cours de ce travail, que la présence des molécules non dissociées était nécessaire dans nos expériences pour contre balancer l'action des agents solubilisants, et que le nombre de ces molécules était en raison inverse de la grosseur que les micelles albuminoïdes ont pris sous l'influence de l'ensemble des solubilisateurs en présence. Depuis que nous savons que l'affinité micellaire est d'ordre adhésif, il est impossible d'adopter intégralement ce qui a été dit provisoirement à propos du mécanisme de la précipition (p. 174). Les micelles ne peuvent pas *attirer*, mais *retiennent* seulement d'une façon plus ou moins énergique les molécules salines non dissociées. Plus la surface micellaire est étendue, plus grandes deviennent les chances d'une rencontre entre les micelles et les molécules, plus facilement et, par conséquent, plus sera faible la concentration dans la zone moléculaire adhérente à la micelle. Cette zone fut appelée par nous protectrice. Elle mérite, en effet, cette dénomination :

L'électricité libre se propageant sur la surface des corps, la micelle colloïde se trouvera isolée, par l'interposition des molécules non dissociées, de l'influence immédiate de l'électricité, et sera libre alors de reprendre son volume initial.

C'est là, en toute sa simplicité, le mécanisme de la précipitation des colloïdes insolubles dans l'eau distillée par les matières minérales.

La littérature chimique abonde en faits qui apportent leur appui à cette manière de concevoir le processus de la précipitation. Nous essayerons de coordonner dans une revue d'ensemble ces faits très disparates à première vue, mal interprétés le plus fréquemment, en ne tenant compte, bien entendu, que des plus saillants.

Mais avant d'aborder ce sujet, nous tirerons une dernière conséquence de notre conception, qui nous fera préciser davantage un caractère essentiel de l'affinité adhésive de la micelle. Nous parlons de l'*affinité élective de la micelle colloïde.*

* * *

Si les molécules minérales non dissociées ne jouent dans le

phénomène de précipitation que le rôle d'un isolant qui permet à la micelle de s'affranchir de l'action solubilisante de sa charge électrostatique, on devrait pouvoir les remplacer par n'importe quelles molécules d'origine minérale ou organique, capables de dissocier électrolytiquement ou non.

Eh bien, lorsqu'on essaie de différentes substances à ce point de vue, on ne tarde pas à reconnaître que les molécules d'origine diverse et quelquefois même de nature chimique très rapprochée sont loin de se comporter d'une façon identique.

Les sels organiques, par exemple, les acétates, les oxalates, les tartrates, les citrates précipitent aussi bien les solutions des albuminoïdes que les sels minéraux; les acides organiques correspondants, par contre, quelle que soit leur concentration, n'y provoquent même pas de trouble.

Ce phénomène n'est guère comparable à celui que nous a présenté l'étude des solutions des albuminoïdes dans la soude, qu'il était impossible de précipiter avec les alcalis plus concentrés. Les micelles, dans ce dernier cas, étaient, en effet, si rapetissées sous l'influence du pouvoir électrisant énergique des ions $\overline{HO}$, qu'elles ne parvenaient pas à retenir les molécules dissociées, fussent-elles neutres ou alcalines. Dans le cas des acides organiques, il est facile de démontrer que la grosseur micellaire est suffisante pour permettre la précipitation.

Une solution des albuminoïdes de Picea excelsa à 1/3 0/0

TABLEAU XIV *a*

CONCENTRATION de l'acide acétique en pour cent.	KCl à 20 p. c.		NH_4NO_3 à 10 p. c.	
	V.R.	C.M.	V R.	C.M.
0,65	0,29	0,340	0,18	0,103
1,30	0,31	0,360	0,20	0,114
2,60	0,37	0,422	0,25	0,139
5,00	0,46	0,501	0,27	0,149
10,00	0,52	0,553	0,30	0,163
20,00	0,54	0,594	0,37	0,196
50,00	0,67	0,675	0,56	0,274

dans l'acide acétique à 1,60 0/0 est distribuée dans une série de tubes à essai à raison de 1 c. c. dans chacune. On ajoute à

ces tubes le même volume d'acide acétique à concentration croissante et on détermine les concentrations salines nécessaires pour provoquer la précipitation.

On voit que la présence de l'acide acétique en assez grande quantité n'empêche pas la précipitation. Les concentrations précipitantes augmentent, il est vrai, avec la richesse de la solution en acide, mais ceci s'explique par l'accroissement progressif du nombre absolu des ions dans la solution et par la diminution parallèle de la grosseur micellaire.

Le nombre des molécules non dissociées de l'acide acétique est beaucoup plus grand déjà dans une solution à 0,65 0/0 qu'il ne faut pour permettre à la couche périmicellaire de se former. Si l'albuminoïde reste en solution malgré la présence de ces molécules, c'est que celles-ci ne peuvent pas être utilisées par les micelles albuminoïdes pour leur défense.

Le même phénomène s'observe avec le saccharose. Il y a cependant cette différence que les concentrations précipitantes des sels, en présence des quantités variables de ce sucre, restent sans altération, le saccharose ne se dissociant pas électrolytiquement. et le nombre des ions dans la solution ne subissant. par conséquent, aucune modification. Les solutions de saccharose

TABLEAU XV

Picea excelsa. Album. de réserve dans la soude à 0,5 pour mille.				
CONCENTRATION de la soude en pour cent.	NH_4Cl à 20 p. c.		NaCl à 20 p. c.	
	V.R.	C.M.	V.R.	C.M.
0,1	0,05	0,091	∞	∞
0,2	0,05	0,091	∞	∞
0,4	0,07	0,127	∞	∞
0,8	0,08	0,144	∞	∞
1,0	0,10	0,178	∞	∞
2,0	0,16	0,276	∞	∞
4,0	0,35	0,558	∞	∞
5,0	0,79	1,060	∞	∞
10,0	∞	∞	∞	∞

sont aussi indifférentes vis-à-vis de la micelle albuminoïde que l'eau distillée.

Les molécules non dissociées de l'ammoniaque se montrent également incapables de servir à la formation de la zone périmicellaire. L'expérience que nous communiquons à l'appui de cette affirmation est tout à fait analogue à celle faite avec de l'acide acétique. (Tab. xv.)

Il y a dans ces essais une double décomposition entre la soude et le chlorure d'ammoniaque, et nous avons en réalité une solution ammoniacale de l'albuminoïde précipité par un mélange de chlorure de sodium et d'ammonium. Ce n'est que grâce à cette décomposition que la précipitation a lieu. Le chlorure de sodium à lui seul n'y arrive point. Les molécules non dissociées de l'ammoniaque, quoique très nombreuses, ne contribuent nullement à la précipitation.

Il en est de même pour les molécules de l'alcool méthylique, et éthylique, de l'acétone, qui ne provoquent pas une modification d'état dans les solutions acides et alcalines des albuminoïdes étudiés par nous.

D'un autre côté, comme on le verra par les nombres communiqués à la fin de ce chapitre, la précipitation des albuminoïdes peut être obtenue avec un hexasaccharide cristallisé, le stachyose, avec la dextrine, la gomme arabique, la peptone de Witte, etc.

La micelle albuminoïde ne retient donc pas indistinctement toutes les particules inertes en présence dans la solution. Elle y procède avec choix.

A l'encontre de l'affinité chimique qui est aussi élective, il est impossible de prévoir d'après la fonction chimique d'un corps la façon dont il se comportera au contact avec la micelle. La différence entre les acides minéraux et organiques est très démonstrative à cet égard. Quelle serait, d'ailleurs, la fonction chimique qui pourrait être remplie, d'une façon également parfaite, par les molécules minérales neutres, acides ou alcalines, par les hydrates de carbone, par la peptone et ainsi de suite?

Peut-être réussira-t-on, en poursuivant l'étude comparée d'un grand nombre de composés chimiques, à saisir les relations qui existent entre la constitution chimique d'un corps et son affinité adhésive à la micelle albuminoïde, relations qui ne seront, certes, pas sans intérêt pour la physiologie générale des échanges

nutritifs de la cellule. Aujourd'hui, en se basant sur les faits qu'on trouve dans la littérature, on peut affirmer presque avec certitude que les affinités adhésives ne sont pas les mêmes pour tous les colloïdes connus.

Il ressort, en effet, des nombres obtenus par M. Schulze pour le sulfure d'arsenic, par M. Prost pour le sulfure de cadmium et par M. Hardy pour l'hydrate de fer, que les acides organiques adhèrent parfaitement bien aux micelles de ces colloïdes conducteurs de l'électricité. Le premier de ces corps peut être précipité de ses solutions colloïdes par l'acide oxalique à 1,5 0/0; le deuxième par l'acide acétique à 6,7 0/0 à peu près, par l'acide tartrique à 0,3 0/0, par l'acide citrique à 0,4 0/0; l'hydrate de fer par l'acide oxalique de concentration moléculaire 0,002 et par l'acide citrique de concentration moticulaire 0,0007.

Le platine colloïdal peut être précipité par l'ammoniaque d'après les recherches de M. Bredig. Il est impossible d'obtenir une précipitation dans les solutions aqueuses d'argent avec de la gomme arabique, comme on le voit dans le travail cité déjà de M. Muthmann.

Tous ces colloïdes d'origine minérale ressemblent, d'autre part, aux albuminoïdes par l'aversion qu'ils ont pour l'alcool, l'acétone, le saccharose et ainsi de suite.

L'affinité élective de la micelle semble donc être aussi une propriété de colloïdes qui pourrait servir de base à la classification de ces corps, comme la grosseur micellaire.

***

Rétention des molécules minérales par les micelles. — Revenons au mécanisme de la précipitation. Il est nécessaire d'admettre tout d'abord, pour être conséquent, que même en présence d'un électrolyte à concentration faible et insuffisante pour précipiter un colloïde de ses solutions, les micelles rencontrent et retiennent les molécules non dissociées. Les molécules retenues par adhésion aux micelles étant éliminées, pour ainsi dire, de l'économie de la solution, il doit s'établir un nouvel état d'équilibre entre les molécules dissociées et non dissociées de l'électrolyte. Le nombre d'ions, quoique augmenté relativement à cause de la diminution de la concentration, sera moindre par rapport à celui d'une solution isotonique du même électrolyte en l'absence du

colloïde. Ceci doit avoir pour résultat une diminution de la conductibilité électrique, un abaissement moins notable de la température de congélation et ainsi de suite.

L'expérience directe confirme ces prévisions. M. Sjœqvist[1], a constaté, en effet, une diminution de conductibilité électrique dans les solutions d'acide chlorhydrique en présence des albuminoïdes.

M. O. Conheim[2] a montré qu'en présence des albumoses ou de la peptone, l'interversion du saccharose par l'acide chlorhydrique baisse notablement, ce qui prouve une diminution dans le nombre d'ions H, ce dernier étant, comme on sait, proportionnel à l'énergie du dédoublement du sucre, toutes choses égales d'ailleurs.

Enfin, MM. Bugarsky et Liebermann[3] ont confirmé la faculté de l'albumine d'œuf et des albumoses de retenir l'acide chlorhydrique et la soude par l'étude comparée de la force électromotrice et de la température de congélation des solutions de ces électrolytes en présence ou en l'absence des matières protéiques. Il résulte des expériences de ces derniers auteurs que la quantité d'acide et de soude retenue par l'albumine d'œuf croît d'abord proportionnellement au poids de ce colloïde introduit dans la solution, ensuite plus lentement. Presque tout l'acide chlorhydrique ou la soude d'une solution de concentration moléculaire 0,05 semble être combiné à l'albumine lorsque le poids de ce dernier atteint 50 fois celui de l'électrolyte en solution. Par l'étude de la force électromotrice, il était impossible, cependant, à MM. Bugarsky et Liebermann de démontrer la rétention du chlorure de sodium.

La concentration de l'électrolyte a atteint le point de précipitation du colloïde. Les micelles sont arrivées à former leurs zones protectrices et l'agglomération commence. On conçoit aisément que les molécules non dissociées adhérentes aux micelles seront nécessairement entraînées avec la matière colloïde et entreront dans la constitution du précipité.

En effet, dans tous les cas où on a étudié la constitution chimique des colloïdes précipités de leurs solutions par des

1. *Skand. Arch. f. Physiologie*, t. V, p. 247.
2. *Zeitsch f. Biologie*, t. XXXIII, p, 487.
3. *Pflüger's Archiv.*, t. LXXII, p. 51, 1898.

substances minérales, on a constaté que la matière inorganique forme une partie intégrante de la masse précipitée. Mais frappés par l'adhésion énergique des matières minérales aux colloïdes, qu'il est impossible de vaincre complètement par le lavage prolongé à l'eau distillée, — adhésion qui s'explique facilement si l'on se rappelle qu'on ne peut atteindre par ce liquide que les micelles placées à la périphérie des flocons, — surpris par la constance du rapport quantitatif entre les substances adhérentes et les colloïdes dans les cas où la précipitation fut obtenue dans des conditions identiques, — constance facile à prévoir en présence des régularités dans les nombres recueillis dans nos tableaux, — tous les auteurs, à peu d'exceptions près, ont conclu à des combinaisons chimiques entre les matières minérales et les colloïdes dans les précipités. La précipitation elle-même fut considérée comme une véritable réaction chimique, analogue à la formation du sulfate de baryte.

Nous trouvons une expérience des plus caractéristiques à cet égard dans un travail déjà fort ancien de M. Béchamp [1] sur les sesquichlorures oxyferriques.

On ajouta du sulfate de potasse à une solution d'hydrate de fer dans du perchlorure, dans laquelle le rapport entre les éléments pouvait être exprimé par la formule $FeCl^3$, 10 Fe^2O^3.

Il se forma un précipité qui fut lavé à fond avec une solution de sulfate de potasse, et ensuite avec de l'eau distillée. Les eaux de lavage présentaient une réaction fortement acide et donnèrent avec le nitrate d'argent un précipité de chlorure qui pesait $1^{gr},025$.

Le précipité d'hydrate de fer fut analysé à son tour. On y trouva :

AgCl correspondant au Cl du précipité.				$0^{gr},041$
$BaSO_4$	—	SO^3	—	$0^{gr},413$
Fe_2O_3				$2^{gr},160$

L'expérience est donc très concluante au point de vue de notre conception. Le précipité a retenu de l'acide chlorhydrique et du sulfate: peu d'acide chlorhydrique et beaucoup de sulfate, parce que les molécules non dissociées de ce dernier sel, ajouté en grande quantité, prédominaient dans la solution.

Il s'en faut de beaucoup que cela soit l'interprétation que

1. *Annales de Chimie et de Physique*, 3e sér., t. LVII, p. 296.

M. Béchamp a donné à cette expérience. Il s'agirait, d'après lui, d'une réaction chimique qui se passerait entre le sulfate de potasse et la solution d'hydrate de fer dans du perchlorure, considérée comme une individualité chimique, comme un sesquichlorure oxyferrique très basique. La réaction consisterait en une double décomposition entre les deux sels, qui aurait pour résultat la formation d'un sulfate oxyferrique insoluble.

Cette hypothèse, plausible à première vue, se heurte, à un examen plus approfondi, à des objections très nombreuses.

Tout d'abord, l'assimilation de la solution d'hydrate de fer dans du perchlorure à un sel défini nous paraît complètement arbitraire. Si l'on admet que la solution $FeCl^3$, 10 Fe^2O^3 présente une individualité chimique, on n'a aucune raison de ne pas reconnaître cette qualité aux solutions $FeCl^3$ 5 Fe^2O^3, $FeCl^3$ 20 Fe^2O^3 — terme extrême de la solubilité de l'hydrate dans du perchlorure de fer d'après M. Béchamp — et à toutes les solutions intermédiaires, contenant même de l'oxyde de fer en *rapport incommensurable* avec le perchlorure. Déjà, à partir du premier de ces termes, toutes les solutions ne permettent plus de déceler le chlore et le fer par les réactions caractéristiques pour ces éléments; elles précipitent en outre d'une façon identique sous l'influence de la même cause. Le rapport incommensurable contredirait, cependant, la loi de Dalton sur les proportions multiples.

Ensuite, en se plaçant au point de vue de l'hypothèse de la double décomposition, on devrait s'attendre à ce que le nombre pour le chlore dans le liquide et pour l'acide sulfurique dans le précipité fussent équivalents. Or, si l'on examine les nombres communiqués plus haut, on constate que le précipité ne contient que la moitié à peu près de l'acide sulfurique demandé par le calcul.

Le précipité contient encore du chlore. Comment cet élément a-t-il pu persister dans le précipité en présence du grand excès de sulfate de potasse dans la solution? M. Béchamp dans ses calculs rattache le chlore à une portion de sesquichlorure initial entraînée par le précipité. L'explication chimique n'évite donc pas la nécessité d'admettre une rétention du sel par adhésion.

Il faudrait pouvoir expliquer aussi l'acidité des eaux du lavage. On ne voit pas comment une double décomposition entre

un sel basique et un sel neutre pourrait donner naissance à un acide libre. On lit d'ailleurs dans le même travail que les chlorures alcalins précipitent également le sesquichlorure oxyferrique hypothétique, et qu'on trouve, comme dans le cas précédent, de l'acide libre dans le liquide surnageant au précipité. Il est impossible, cependant, d'admettre une double décomposition entre deux chlorures.

Il y a donc une incompatibilité évidente entre les notions fondamentales de la chimie minérale et l'hypothèse que nous venons de discuter. Ceci n'a pas empêché pourtant qu'elle fût reprise tout récemment par MM. Wyrouboff et Verneuil à propos des oxydes de terres rares.

Ces auteurs, en adversaires résolus « de ce qu'on a appelé la physico-chimie, de cette branche du savoir qui a le grand avantage d'être à la portée de tout le monde, car elle n'exige ni la rigueur des méthodes de la vraie physique ni les longues recherches de la vraie chimie[1] », n'ont pas épargné leurs efforts pour démontrer le caractère purement chimique des phénomènes que nous étudions. Comme ce n'est pas par des considérations générales qu'il sied de combattre les conceptions qu'on nous dit basées sur de longues recherches expérimentales, mais par la critique serrée des faits et des conclusions qu'on en tire, on nous excusera les détails dans lesquels nous sommes obligé d'entrer.

***

MM. Wyrouboff et Verneuil ont étudié les oxydes de thorium, de cérium et de fer qui présentent des rapports très analogues. Il suffit donc d'exposer leurs recherches concernant l'un de ces oxydes.

L'oxyde de thorium qu'on obtient en calcinant l'oxalate de cette base est traité à chaud avec l'acide chlorydrique ou nitrique concentré. On décante l'acide et on reprend le résidu avec de l'eau distillée. L'oxyde entre en solution, sauf la partie « la plus condensée » qui est séparée par filtration. La solution est limpide et contiendrait « les chlorydrates ou les nitrates de deux polymères de ThO et une certaine quantité de $ThCl^2$ ou ThN^2O^6 ». C'est cette proposition que les auteurs cherchent à

1. Wyrouboff et Verneuil, Sur les oxydes condensés des terres rares. *Bull. de la Soc. chimique de Paris*, 3e série, t. XXI, p. 118, 1899.

démontrer en essayant de séparer les polymères et en les soumettant à l'analyse.

On ajoute à la solution limpide 1/10 de son volume de HCl et on obtient un précipité qui est filtré, redissous dans l'eau et reprécipité par l'acide chlorydrique à 10 0/0. Après une dernière décantation, il est séché au bain-marie. On arrive ainsi à un corps qui aurait une composition parfaitement constante, qui contient de l'acide chlorhydrique et dans lequel le rapport ThO : Cl = 12 : 1.

Mais l'acide chlorydrique à 10 0/0 n'a pas précipité toutes les matières de la solution primitive. Les substances restées en solution, et qu'on peut isoler à l'état solide en précipitant le liquide filtré avec son volume d'acide chlorhydrique, présenteraient un rapport de ThO : Cl = 5 : 1.

Ce serait l'autre polymère moins condensé.

« Il est possible pourtant, ajoutent les auteurs, que ce soit encore un mélange et qu'il contienne un peu du corps précédent que les fractionnements ne parviennent pas à lui enlever ; peut-être le rapport entre la thorine et le chlore dans le terme moins polymérisé est-il de 4 : 1. »

On nous accorde donc la possibilité d'un doute sur la constitution chimique de ce second polymère. Ses réactions chimiques et ses propriétés physiques sont-elles du moins plus élucidées?

Les deux combinaisons salines de l'oxyde de thorium différement condensé se distinguent par quelques points des sels minéraux ordinaires, sans toutefois présenter rien, suivant M. Wyrouboff, qui ne s'adapte à nos notions chimiques actuelles. Les chlorures de thorine condensée sont formés sans élimination d'eau et ne donnent pas, à l'instar des sesquichlorures oxyferriques de M. Béchamp, de précipité de chlorure d'argent, tout au plus un louche, lorsqu'on ajoute à leurs solutions aqueuses du nitrate de ce métal.

Nous possédons effectivement dans la chimie minérale des exemples où un élément quelconque ne peut pas être décelé par ses réactions spécifiques : le fer dans les ferrocyanures, le chlore dans certaines combinaisons des chlorures métalliques avec l'ammoniaque, sur lesquelles M. Werner a attiré l'attention depuis 1893 et ainsi de suite. Mais alors ces éléments ne se séparent pas par dissociation dans l'eau et ne peuvent pas être

remplacés par double décomposition avec d'autres sels.

Est-ce le cas dans les expériences de MM. Wyrouboff et Verneuil? Evidemment non. On lit page 127 de leur mémoire : « On peut transformer facilement les chlorhydrates des deux corps en nitrate et réciproquement. Il suffit pour cela de précipiter les chlorydrates par l'acide nitrique ou un nitrate, et les nitrates par l'acide chlorhydrique ou un chlorure. » Les chlorures en question entrent donc en double décomposition avec les nitrates et devraient, par conséquent, donner avec l'argent le chlorure caractéristique.

Mais MM. Wyrouboff et Verneuil ne s'arrêtent pas devant cette contradiction de principe. Ils s'intéressent plutôt à la détermination de la valence de deux bases polymérisées, et voici comment ils s'y prennent.

Ils ajoutent à la solution d'un chlorure de thorine condensée de la soude titrée en quantité suffisante pour saturer juste la moitié de l'acide. « A ce moment précis la liqueur est devenue trouble, une petite quantité de chlorhydrate d'ammoniaque précipite ce corps, qui n'est plus soluble dans l'eau et qui contient moitié moins d'acide que le corps primitif. » On peut obtenir un corps analogue sans avoir neutralisé la moitié d'acide, « en précipitant la solution du nitrate ou de chlorhydrate par $SO^4(NH^4)^2$. Le sulfate ainsi formé est entièrement insoluble, il se dissocie petit à petit dans l'eau et après lavage prolongé il ne renferme plus que la moitié d'acide sulfurique » (page 128).

Les auteurs concluent : 1° que ces composés ne sont pas des sels basiques, puisqu'ils donnent des solutions à réaction acide et sont précipitables par les acides même concentrés; 2° que chacun des deux donne deux composés, l'un soluble renfermant deux molécules d'acide bibasique, l'autre insoluble n'en renfermant qu'une. « Dès lors les deux rapports ThO : HCl que nous avons trouvés deviennent 48 : 4 et 20 : 4. »

Analysons rapidement jusqu'à quel point les conclusions répondent aux expériences, et délimitons bien ce qui est appuyé sur l'observation directe de ce qui est inspiré par l'idée préconçue.

On ne voit pas tout d'abord sur quoi est basée la conclusion 2. Dans l'expérience avec la soude, le liquide n'est devenu que trouble, et pour précipiter le sel dont deux atomicités étaient

saturées par l'acide, on était obligé d'ajouter du chlorure d'ammonium. La combinaison, renfermant une molécule d'acide bibasique, était donc aussi soluble que celle qui en contenait deux. Dans l'autre expérience avec le sulfate d'ammonium, les deux combinaisons étaient également insolubles dans l'eau.

Mais voilà un point plus important. Pourquoi les auteurs ont-ils neutralisé avec de la soude juste la moitié d'acide ? C'est ce détail de l'expérience qui les amène, évidemment, à déclarer les bases condensées comme possédant une double valence. Or, l'expérience n'aurait pas changé s'ils n'avaient neutralisé qu'un tiers ou un quart d'acide, ou même s'ils n'avaient point ajouté de soude. Ce n'est pas parce que l'acide avait été en partie neutralisé que la solution des chlorures de thorine condensée devenait précipitable par le chlorure d'ammonium ou par les chlorures en général, elle l'était déjà avant, comme on le voit par les expériences de M. Béchamp et les nombres déjà cités de M. Hofmeister pour l'hydrate de fer, très analogue à la thorine par ses rapports aux sels et aux acides, comme le reconnaissent MM. Wyrouboff et Verneuil eux-mêmes. Et si ces savants n'avaient pas essayé le chlorure d'ammonium avant la neutralisation, n'est-ce pas parce qu'ils présumaient, à juste raison d'ailleurs, que le précipité ne serait pas obtenu, vu l'impossibilité d'une double décomposition entre deux chlorures ?

Les réactions chimiques entre les oxydes « condensés » de thorium et les matières minérales solubilisantes et précipitantes deviennent de plus en plus douteuses et les formules indiquées par les auteurs perdent toute leur signification.

Comment, d'ailleurs, se représenter cette condensation variable du même oxyde sous l'influence de la calcination à la même température et sous l'influence aussi de l'eau, puisque plus on dialyse un chlorure de thorine condensée, plus grand devient le rapport ThO : Cl; après 30 jours de dialyse, il est de 100 : 0,35. Comment expliquer la polymérisation d'un oxyde de constitution chimique très simple et sans atomicités libres qui aurait pour résultat la formation des bases pouvant saturer deux molécules d'acide bibasique, la polymérisation n'étant pas un phénomène d'agrégation physique, mais une réunion chimique par saturation mutuelle d'une partie des atomicités libres des molécules ?

Autant de questions, sur lesquelles MM. Wyrouboff et Verneuil nous doivent encore la réponse.

Loin de nous la pensée de mettre en doute l'exactitude des *faits* communiqués par ces auteurs. Leurs observations contradictoires peuvent facilement être coordonnées si l'on adopte le mécanisme des modifications d'état des colloïdes développé dans ce travail.

L'oxyde de thorium est un colloïde : ses micelles ne se dissocient pas dans l'eau. Elles dépassent au surplus par leur volume la limite de la solubilité dans ce dissolvant. En reprenant avec de l'eau le résidu après décantation de l'acide concentré, on se trouve en présence de l'acide à concentration faible. Les micelles sont diminuées sous l'influence des ions de l'acide, et la thorine entre en solution, comme les autres colloïdes étudiés par nous.

Ajoutons maintenant de l'acide à 10 0/0. Les molécules non dissociées arrivent à former la zone périmicellaire et l'oxyde de thorium précipite, entraînant avec lui un certain nombre de molécules HCl, *toujours le même, si les conditions sont identiques*, et beaucoup inférieur à celui que nous avons introduit dans le liquide.

Mais tout l'oxyde en solution n'est jamais précipité par une concentration même assez forte de l'acide, comme nous l'avons observé aussi pour les albuminoïdes. Avec la diminution de la concentration du colloïde augmente la concentration du sel ou de l'acide nécessaire à la précipitation; c'est là la cause qui a amené MM. Wyrouboff et Verneuil à admettre l'existence du polymère moins condensé, dont les solutions ne sont précipitables que par l'acide chlorhydrique dilué avec son volume d'eau.

Les précipités obtenus avec les acides sont solubles dans l'eau. Une partie des molécules non dissociées d'acide entraînées par les micelles devient libre au contact avec de l'eau distillée, s'y dissocie électrolytiquement et, grâce au pouvoir électrisant notable de ses ions, arrive facilement à diminuer les micelles. Si, au lieu de précipiter l'oxyde de ses solutions par un acide, on ajoute un sel quelconque, soit un chlorure, un nitrate ou un sulfate, *ce n'est plus l'acide qui est entraîné par les micelles, mais bien les molécules salines*. Ces précipités délayés dans de l'eau lui abandonnent également un certain nombre de molécules

salines. Mais en l'absence des ions à mobilité forte, les micelles ne peuvent pas entrer en solution. C'est le secret de l'insolubilité des précipités obtenus avec le sulfate et le chlorure d'ammonium dans les expériences qui devaient nous fixer sur la valence des oxydes polymérisés.

Le précipité provoqué par l'acide abandonne à l'eau de l'acide jusqu'à ce qu'un équilibre soit établi entre la grosseur micellaire et les ions libres. Si l'on éloigne ceux-ci par dialyse, une nouvelle quantité se détachera des micelles et ainsi de suite, d'où l'augmentation du rapport entre la thorine et le chlore dans le contenu du dialyseur.

Enfin, la quantité des ions nécessaires pour solubiliser un colloïde n'est pas très grande. Une solution d'acide acétique équimoléculaire avec celle de l'acide chlorhydrique à 1 0/00 présente 760 fois moins d'ions que cette dernière: elle arrive, cependant, à dissoudre 1/3 0/0 de son poids d'albuminoïdes de réserve de Picea excelsa. Pour expliquer la solubilité d'un gramme de précipité qui répond à la formule $ThO^{48}\ HCl^{4}$ et qui contient 1.2 0/0 d'acide chlorhydrique dans 100 c. c. d'eau, il suffirait d'admettre, si la grosseur et l'élasticité micellaires étaient les mêmes, que 1/200 d'acide se soit séparé des micelles de la thorine. Ceci amènerait à une concentration de l'acide libre égale à 0,0006 0/0. Cela n'est pas étonnant si le nitrate d'argent ne produit qu'un louche dans ces solutions.

*
* *

En poursuivant l'exposé des travaux où la rétention des molécules salines fut démontrée par l'analyse chimique du précipité, je rapellerai ici l'étude de MM. Linder et Picton[1] sur la rétention des quantités mesurables d'acide sulfhydrique par les sulfures de métaux Les auteurs tendent aussi à admettre une combinaison chimique entre l'hydrogène sulfuré et les sulfures. Cette interprétation fut l'objet d'une critique approfondie de la part de M. Duclaux[2] qui, après avoir relevé le caractère mal défini des combinaisons en question, la disproportion entre le poids des sulfures et de l'acide sulfhydrique. la variabilité dans les proportions suivant les conditions de la précipitation, a fait

1. *J. of. Chem. Soc.*, t. LXI, p. 114, 1892.
2. *Traité de Microbiologie*, t. II, p. 274-276.

rentrer les faits étudiés par MM. Linder et Picton dans la catégorie des phénomènes d'adhésion moléculaire.

Nous passerons donc directement aux recherches ultérieures des mêmes auteurs[1] qui ont eu pour but de prouver, à l'encontre des expériences que nous venons de citer, que ce sont les ions positifs seuls qui sont retenus par le précipité.

Une solution de sulfure d'arsenic fut précipitée avec une quantité connue de chlorure de baryum. Le liquide fut ramené jusqu'à 250 c. c. et laissé déposer. On dosa le baryum et le chlore dans deux portions différentes de 100 c. c. et on trouva :

Ba	0,02422	Cl	0,01380	au lieu de
—	0,02663	—	0,01380	calculé d'après la teneur en chlorure de baryum.

Le précipité de sulfure d'arsenic semble donc avoir retenu à peu près 5 milligrammes de Ba en plus de ce que contenait l'eau qui l'imbibait. L'analyse a montré, en effet, que le précipité retenait du Ba qu'il était impossible d'extraire par le lavage à l'eau distillée, mais qu'on pouvait séparer par l'action des solutions salines. Dans l'extrait salin on n'a pu démontrer la présence du chlore.

Cette dernière constatation ne prouve pas, il va sans dire, que l'ion négatif n'était pas retenu par le précipité. Le soufre de l'hydrogène sulfuré est aussi électronégatif que le chlore, il était cependant retenu par les sulfures des métaux dans les expériences qui précèdent.

Le déficit en baryte dans la liqueur surnageant au précipité se laisse assez bien expliquer par la diffusion inégale des ions positifs et négatifs dans le liquide sous l'influence de la charge électrique du colloïde insolubilisé.

On a vu que M. Béchamp, MM. Wyrouboff et Verneuil, guidés par leur hypothèse de la double décomposition, se sont contentés de rechercher l'acide dans les précipités obtenus avec des sels, et ont calculé leurs formules comme si la partie électropositive du sel n'était pas retenue. MM. Linder et Picton, au contraire, supposant aux ions positifs une action précipitante, n'ont trouvé dans le précipité que la partie positive de l'électrolyte. Ces expériences se complètent donc très heureusement.

M. Ritthausen, qui ne cherchait à démontrer aucune hypo-

1. *J. of. Chem. Soc.*, t. LXVII, p. 66, 1895.

thèse, mais qui observait purement et simplement les faits, a toujours pu constater dans les cendres, au cours de l'analyse de nombreux précipités albuminoïdes provoqués par l'acide acétique dans les extraits alcalins des graines, la présence, à côté de l'acide phosphorique, de la potasse, de la magnésie, de la chaux, etc., bref, de toutes les bases qu'on rencontre normalement dans les extraits combinées à l'acide oxyméthylenphosphorique et aux autres acides organiques [1].

Sous un autre aspect nous apparaissent les phénomènes de rétention des substances minérales dans les expériences récentes de MM. Spiro et Pemsel [2] par lesquelles nous allons terminer cette série de faits. Elles ont eu pour point de départ le désir de perfectionner la méthode de détermination de l'alcalinité du sang. Pour éviter la difficulté que l'on rencontre à bien saisir le virage, lorsqu'on titre en présence des albuminoïdes, ces auteurs ont eu l'idée de précipiter les matières protéïques du sérum avec du sulfate d'ammonium en milieu acide et de déterminer dans une partie aliquote du liquide filtré la quantité d'acide restée libre après la neutralisation de l'alcalinité du sang. A leur surprise, le sang dans ces conditions se montra beaucoup plus alcalin qu'à la titration directe. En augmentant progressivement la quantité d'acide ajouté avant la précipitation, on obtint des résultats qui pouvaient faire penser à une augmentation de l'alcalinité du sang. La précipitation, effectuée en présence de l'alcali fixe, eut un résultat contraire : l'alcalinité du sang se montrait plus faible.

1. L'opinion de MM. Hammarsten et Wiman, d'après laquelle l'acide phosphorique serait combiné chimiquement aux albuminoïdes de réserve des graines végétales sous forme de nucléoprotéïdes, est contredite par les travaux de MM. Osborne et Campbell, qui ont pu préparer ces matières protéïques avec une teneur infime en phosphore (*J. Amer. Chem. Soc.*, t XX. p. 410).

Ce fait, impossible à comprendre si l'on admet que le phosphore entre dans la constitution chimique du précipité, s'explique facilement, au point de vue de l'hypothèse de la rétention des molécules salines par adhésion aux micelles, si l'on examine la méthode dont se sont servis MM. Osborne et Campbell pour la préparation des albuminoïdes en question. Ces auteurs précipitaient les extraits salins des graines par saturation avec le sulfate d'ammonium, redissolvaient le précipité dans l'eau et soumettaient la solution à la dialyse. Ce sont les fractions successives des albuminoïdes qui se séparaient dans le dialyseur au fur et à mesure de l'appauvrissement du liquide en sel, qui furent soumises à l'analyse. Les phosphates organiques de l'extrait initial étaient donc submergés dans la masse énorme des sels alcalins qui ont servi pour la précipitation, et les micelles ne retenaient des phosphates que dans la proportion très faible où ils se trouvaient dans le liquide environnant.

2. *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, t. XXVI, p. 233, 1898.

Il n'y a qu'un seul moyen d'expliquer ces phénomènes. Les précipités albuminoïdes retiennent une partie d'acide et de soude qui, échappant ainsi à la titration, viennent fausser les résultats de l'analyse dans l'un ou dans l'autre sens.

Les auteurs, tout en voyant que cette rétention ne peut pas être attribuée à une réaction chimique véritable, étant donnée l'augmentation de la quantité de réactif retenu parallèle à l'élévation du volume de réactif ajouté avant la précipitation, concluent cependant à une « capacité basique du sang et des albuminoïdes », à l'existence des groupements basiques et acides dans la molécule albuminoïde la plus neutre en apparence. Bien étranges sont ces fonctions chimiques de la molécule albuminoïde qui ne peuvent être saturées qu'au moment de la précipitation !

Il faudra se faire, je crois, tôt ou tard à l'idée que *les différentes capacités de la micelle colloïde ne sont que les manifestations de l'affinité adhésive, et que là où il y a précipitation des colloïdes en présence des matières minérales, il y a aussi rétention de ces matières par les précipités.*

La première conséquence pratique à tirer de cette notion sera la proscription rigoureuse de l'emploi des sels d'ammoniaque et des sulfates pour la précipitation et purification des albuminoïdes dont on aura l'intention de déterminer la constitution élémentaire. On risquera toujours d'obtenir, malgré un lavage prolongé à l'eau distillée, des nombres trop forts pour l'azote ou pour le soufre. C'est là probablement la cause de la différence frappante dans les dosages d'azote des albuminoïdes de réserve provenant d'une même espèce de graines que l'on constate dans les travaux de M. Ritthausen et de MM. Osborne et Campbell. Les nombres pour l'azote chez ces derniers auteurs qui précipitaient les albuminoïdes, dans une phase de leur préparation, par le sulfate d'ammonium, sont presque toujours supérieurs.

L'emploi de ce sel pourra simuler aussi des différences dans les cas où, en variant les conditions, on provoquera une rétention plus ou moins grande des molécules salines par les mêmes micelles albuminoïdes. Quelques-unes des analyses de MM. Osborne et Campbell sont très suggestives à ce point de vue.

Trois préparations d'albuminoïdes de lupin jaune de même

provenance, obtenues par la méthode indiquée dans une note précédente ont donné à l'analyse :

C	N	S
50,62	17,45	0,77
50,20	17,86	0,98
49,47	18,07	1,49 [1]

Différence qui correspond bien à la rétention de 1,3 0/0 de sulfate d'ammonium pour la deuxième préparation et de 3 0/0 à peu près pour la troisième. Exemple bon à retenir.

***

Il nous reste encore à examiner *la précipitation des albuminoïdes par les colloïdes à petites micelles*. Nous l'avons assimilée précédemment à la précipitation à l'aide des sels. *M. Kutscher* [2], qui a le premier observé, il y a à peu près quatre ans, qu'une solution de sérum globuline, de vitelline ou de myosine dans du carbonate de soude très faible peut être précipitée par les albumoses isolées ou par le mélange des produits de la digestion pepsique connue sous le nom de peptone de Witte, est d'un avis quelque peu différent. L'explication la plus plausible de ce phénomène serait, d'après lui, la suivante. Nous citons textuellement :

« La globuline entre en solution sous l'influence du carbonate de soude, grâce à la formation à ses dépens d'un sel soluble de soude. On peut invoquer en faveur de cette transformation la stabilité relative de la combinaison qui résiste à la dilution avec de l'eau, et n'est détruite que par un courant d'acide carbonique ou par l'acide acétique. Il est probable que le globulinate de soude subit une décomposition analogue. La soude est éliminée et par l'adjonction de l'albumine à la globuline il se forme une combinaison un peu moins soluble dans les liqueurs alcalines, mais identique par ses autres propriétés à la globuline initiale. »

Comme cette interprétation, qui est une fidèle expression des idées courantes sur la solubilisation, semble être généralement acceptée sans opposition [3], j'ai cru nécessaire de la soumettre à une critique expérimentale :

1. *J. of. Amer. Chem. Soc.*, t. XIX, p. 454.
2. *Zeitsch. f. physiol. Chemie.*, t. XXIII, p. 115, 1897.
3. A. Kossel, *Revue générale des Sciences*, 1899, p. 380 ; Ivar Bang, *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, t. XXVII. p. 463, 1899.

1. On sait que la précipitation par formation d'une combinaison chimique insoluble n'est pas influencée, dans la plupart des cas, par la concentration des matières qui réagissent et ne dépend pas de l'ordre dans lequel les matières sont mises en contact.

Prenons donc 2 c. c. d'une solution de peptone de Witte à 10 0 0 et versons-y une goutte d'une solution des albuminoïdes de Picea excelsa à 1 0/0 dans l'acide chlorhydrique à 1 0/00, identique à celle qui nous a servi pour les expériences antérieures. Un précipité à gros flocons se forme et se dépose au fond de l'éprouvette. Ajoutons maintenant à 2 c. c. de solution d'albuminoïdes 1 goutte de notre solution de peptone, — léger trouble qui disparaît à l'agitation. Si l'on continue à verser de la peptone, il arrive un moment où un précipité très abondant et persistant apparaît. Le volume de la solution de peptone ajouté est alors de 0,58 c. c., d'où on calcule une concentration de la peptone dans l'éprouvette égale à 2,25 0/0. Répétons la même expérience avec une solution de peptone à 5 0/0. Pour faire apparaître le précipité, il nous faut ajouter 1,46 c. c. de peptone, ce qui correspond à une concentration précipitante égale à 2,21 0/0.

Ces expériences prouvent que la concentration de la peptone est le facteur le plus important dans la production du précipité, comme nous l'avons vu aussi pour les sels.

2. Supposons maintenant avec M. Kutscher que les 2,25 0/0 de la peptone entrent en réaction chimique avec le 1 0/0 de l'albuminoïde. Ces relations devraient du moins persister lorsqu'on modifiera les conditions de l'expérience. Nous allons voir qu'il n'en est rien.

Diminuons la concentration de l'albuminoïde, tout en laissant l'acide chlorhydrique sans altération, et cherchons à déterminer les quantités de peptone nécessaires à la précipitation de 2 c. c.

Solution de l'albuminoïde en 0 0 dans HCl à 1 0 00.	Volume de peptone à 10 0/0 ajouté.	Concentr. précipitante de la peptone en 0/0.
1/2	0,57	2,22
1/4	0,55	2,16
1/8	0,56	2,19
1/16	0,58	2,25
1/32	0,57	2,22

Les concentrations de la peptone restent donc les mêmes,

malgré la diminution de la quantité d'albuminoïde dans l'éprouvette.

Diminuons en même temps la concentration de l'acide.

Concentration de l'albuminoïde en 0/0 et de l'acide chlorydrique en 0/00.	Volume de peptone à 10 0/0 ajouté.	Conc. de la peptone en 0/0.
1/2	0,32	1,380
1/4	0,19	0,865
1/8	0,10	0,476
1/16	0,06	0,300
1/32	0,04	0,196

La concentration précipitante de la peptone baisse parallèlement, mais beaucoup moins vite.

Augmentons, enfin, la concentration de l'acide chlorhydrique, en laissant celle de l'albuminoïde à 1/2 0/0.

Concentration de HCl en 0/00.	Volume de peptone à 10 0/0 ajouté.	Conc. de la peptone en 0/0.
1,5	0,90	3,10
2,1	1,38	4,08
3,0	1,56	4,38
5,5	2,52	5,57

On voit qu'avec l'augmentation de la concentration de l'acide chlorhydrique, les concentrations précipitantes de la peptone s'élèvent; elles s'élèvent cependant moins vite. Les concentrations de la peptone suivent donc toujours celles de l'acide chlorhydrique, et on aurait pensé plutôt à une combinaison de la peptone avec de l'acide, si le parallélisme des variations était complet et si le mélange n'était pas très acide.

Les variations de la concentration de la peptone ont en réalité l'allure des modifications du nombre des molécules dissociées de l'acide, qui diminue et augmente aussi moins vite que la concentration. Or, nous savons que la grosseur de la micelle albuminoïde est en raison inverse du nombre d'ions ou de molécules dissociées, et qu'une micelle plus petite demande une concentration plus grande des molécules non dissociées pour pouvoir s'entourer d'une zone protectrice. Les expériences avec la peptone ne font donc que confirmer la règle, et exclure même la possibilité d'une réaction chimique entre l'albuminoïde et la peptone.

Ces expériences furent répétées avec les albuminoïdes de *Cucurbita Pepo*, *Lupinus albus et luteus*. Le résultat fut le même. Nous n'indiquerons ici que les concentrations de la peptone qui précipitent en présence de l'acide chlorhydrique à 1 0/00.

Cucurbita Pepo.	*Lupinus albus.*	*Lupinus luteus.*
2,30 0/0	2,25 0/0	2,30 0/0

Concentrations presque identiques pour tous les albuminoïdes étudiés. La soude, en agissant plus profondément sur les micelles, va également, dans le cas de la peptone comme dans celui des sels, exagérer les différences. Une solution des albuminoïdes dans NaHO à 0,5 0/00 précipite à une concentration de la peptone de Witte égale à :

Picea excelsa.	*Cucurbita Pepo.*	*Lupinus albus.*
0,655 0/0	0,825 0/0	1,34 0/0

3. La sérumalbumine et l'albumine d'œuf ne partageraient pas d'après M. Kutscher la faculté de la globuline de se combiner avec les albumoses. On devrait donc pouvoir séparer ces deux albuminoïdes, qu'on suppose différentes, en ajoutant de la peptone de Witte au blanc d'œuf ou au sérum sanguin. L'expérience reste cependant négative.

On peut diluer le blanc d'œuf avec 11,5 vol. HCl à 1,1 0/00 sans modifier le résultat de l'expérience. La même solution chauffée à 70° et refroidie précipite avec la peptone de Witte comme avec nos réactifs salins. La concentration précipitante est de 2,30 0/0.

Le blanc d'œuf dilué avec 11,5 vol. de soude à 0,5 0/00, chauffé à 70°, ne précipitait pas, comme on se le rappelle, avec les sels à froid, il ne précipite pas non plus avec la peptone. A la température d'ébullition, cette solution coagulait en présence des sels ammoniacaux. *Elle coagule aussi en présence de la peptone*, et les flocons coagulés qui en résultent sont aussi insolubles dans les alcalis et les acides que le blanc d'œuf cuit.

L'analogie entre la précipitation saline et albumosique est donc complète.

Encore ici l'étude méthodique des conditions de la précipitation nous permet de prévoir et d'expliquer des phénomènes qui n'étaient jusqu'ici que fortuits et empiriques.

Supposons qu'un albuminoïde quelconque en solution dans l'acide chlorhydrique est soumis à l'action de la pepsine. Comme cette diastase protéolytique n'agit que graduellement sur l'albuminoïde en présence, il y aura pendant assez longtemps dans la solution, à côté des albumoses, des micelles albuminoïdes non encore attaquées. Il peut arriver que la concentration des albu-

moses formées devienne suffisante pour précipiter l'albuminoïde non altéré. Ceci aura lieu d'autant plus sûrement que la concentration de l'albuminoïde au début de l'expérience aura été plus forte et celle de l'acide chorhydrique plus faible. Le précipité qu'on obtiendra dans ces conditions sous l'influence de la pepsine pourra facilement être pris pour une « nucléine ». pour un résidu de la digestion pepsique d'un nucléoprotéide.

C'est M. Wiman[1] qui a réalisé, sans s'en douter, cette expérience avec de la légumine des pois dont il cherchait à démontrer la parenté avec les nucléoprotéïdes. Le tableau XVI résume la partie la plus intéressante de ses essais. On y trouve les poids des précipités en 0/0 qu'on obtient en variant la concentration de l'acide chlorhydrique et des albuminoïdes.

TABLEAU XVI

La concentration de la légumine en 0/0.	La concentration de l'acide chlorhydrique en 0/0.			
	0,3	0,4	0,5	0,6
1,29	4,55	0,0	0,0	0,0
2,27	2,70	0,29	0,0	0,0
3,18	4,17	1,42	0,26	0,0
4,52	5,90	1,60	0,40	0,11
5,23	9,20	12,3	7,40	1,7

On voit que le poids du précipité augmente avec l'élévation de la concentration de l'albuminoïde, diminue avec l'augmentation de la concentration de l'acide Le précipité n'apparaît pas lorsqu'en présence de beaucoup d'acide la concentration de l'albuminoïde est assez faible.

Des expériences analogues à celles de M. Wiman ont amené M. Neumeister[2] à la création de la conception de l'hétéroalbumose — albumose insoluble dans l'eau qui formerait avec la protalbumose les deux premiers produits de décomposition de la molécule albuminoïde sous l'influence de la pepsine. Pour séparer ces deux corps, on a recours à la dilution des produits de digestion avec beaucoup d'eau ou à la dialyse : l'hétéroalbu-

1. *Loc. cit.*
2. *Lehrbuch der physiol. Chemie.* Iena, 1897, p. 230.

mose est précipitée dans ces conditions. Or, il est infiniment probable que ce corps n'est rien d'autre que l'albuminoïde initial non encore touché par la pepsine qui précipite sous l'influence des albumoses déjà formées (protalbumoses) grâce à la diminution de la concentration d'acide. La preuve en est dans la faculté de l'hétéroalbumose de se transformer en dysalbumose, rappelant par ses propriétés un albuminoïde à grosses micelles, sous l'influence des causes anodines, comme le contact prolongé avec l'eau, la dessiccation, etc.

4. Si les expériences qui précèdent n'étaient pas plus que suffisantes pour démontrer l'inexactitude de la thèse soutenue par M. Kutscher, on aurait trouvé l'argument décisif contre elle dans la faculté que possèdent la plupart des colloïdes à petites micelles de précipiter les albuminoïdes. Déjà le blanc d'œuf

TABLEAU XVII

Solution des albuminoïdes de réserve dans NaHO à 0,5 0/00.			
RÉACTIF	Picea excelsa.	Cucurbita Pepo.	Lupinus albus.
Stachyose.....	12,50	18,2	—
Dextrine.....	10,35	15,8	15,00
Gomme arabique.... .	2,80	—	3,42
Gomme de bois.....	0,283	0,386	—

naturel, dans lequel les micelles sont très rapetissées sous la double action de l'alcali et de l'albuminase, se comporte à ce point de vue vis-à-vis des micelles albuminoïdes comme les albumoses. La plupart des polysaccharides solubles dans l'eau agissent de même. Le tableau XVII indique en 0/0 les concentrations précipitantes pour quelques-uns d'entre eux.

Les précipités sont floconneux et ne se distinguent en rien de ceux qu'on obtient avec les sels ou avec la peptone de Witte.

Mais, chose curieuse, lorsqu'on s'adresse à des solutions acides des albuminoïdes, qui se prêtent ordinairement mieux aux essais sur la précipitation que les solutions alcalines, on est étonné de voir que le stachyose et la dextrine ne produisent aucun effet précipitant. La gomme arabique laisse paraître un précipité à la concentration de 2,36 0/0 pour les albuminoïdes

du sapin rouge, de 2 0/0 pour ceux du lupin blanc et de 1,38 0/0 pour le blanc d'œuf dilué et chauffé, mais ce précipité est d'un aspect bien étrange. Ce ne sont plus des flocons qui se forment, mais des globules assez fins, très réfringents. Ils se déposent lentement, en se rassemblant au fond de l'éprouvette en une masse gluante, presque sirupeuse. C'est, évidemment, la gomme qui s'est précipitée dans ce cas et non l'albuminoïde.

Ce fait me semble indiquer qu'au contact des micelles protéiques et hydrocarbonées, il y a une perturbation dans les résultats de l'électrisation des micelles par les ions.

On dirait qu'au contact de ces micelles hétérogènes, l'albuminoïde se charge positivement, le polysaccharide négativement. La charge positive, qui paraît être assez forte, neutraliserait une partie de la charge négative de l'albuminoïde en solution alcaline, et le ferait plus accessible à la précipitation ; elle augmenterait, au contraire, la charge positive des mêmes micelles dans la solution acide qui, devenant trop petites, ne pourraient plus être précipitées par le stachyose et la dextrine. En revanche, elles précipiteraient à leur tour les micelles de la gomme arabique devenues relativement plus grandes dans ces conditions.

Ces phénomènes de contact entre les micelles albuminoïdes et hydrocarbonées mériteraient d'être repris sur une base expérimentale plus large. Il est à espérer que par leur étude on se rapprochera de la connaissance du mode d'action des diastases décoagulantes, si toutefois celles-ci agissent réellement en excitant une charge électrique dans les micelles albuminoïdes, comme nous l'avons supposé précédemment.

En résumé, aucun des faits variés que nous avons passés en revue dans ce chapitre ne s'adapte à l'explication chimique des phénomènes de précipitation. Ils plaident, au contraire, tous en faveur du mécanisme de la précipitation par formation d'une zone périmicellaire, en prouvant la réalité de la rétention des molécules salines ou d'autres particules par les micelles colloïdes. Cette rétention est due uniquement à l'affinité adhésive et élective des *unités* physiques.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE JUILLET 1901 No 7

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ DANS LA FIÈVRE RÉCURRENTE

PAR LE PROF. SAWTSCHENKO ET LE Dr MELKICH (DE KASAN).

M. Metchnikoff, dans son travail sur la fièvre récurrente[1], a solidement établi ce fait, que la chute critique de la température et la disparition des spirilles du sang coïncident toujours avec une phagocytose bien marquée des spirilles dans la rate.

La constance de ce phénomène et son rapport causal avec la guérison confirmaient si bien la théorie phagocytaire de l'immunité, que *M. Metchnikoff* a exprimé l'opinion que la fièvre récurrente pourrait servir de « pierre de touche » pour la doctrine de la phagocytose.

Mais le spirille se montra très sensible non seulement vis-à-vis de la phagocytose, mais encore vis-à vis des anticorps spécifiques, découverts par Pfeiffer.

M. Gabritschewsky[2], en étudiant sous ce rapport les propriétés du sérum apyrétique des malades atteints de la fièvre récurrente, a découvert un fait très intéressant, que le sérum pris pendant les premiers jours de l'apyrexie et surtout après le dernier accès, ajouté à du sang contenant des spirilles, abrégeait considérablement leur vie : ce sérum se montre donc spécifiquement bactéricide.

1. *Virch. Arch.*, 1887.
2. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1896.

Après s'être assuré que lorsqu'il y a rechute de la maladie, les propriétés bactéricides du sérum, très prononcées chez les convalescents, retombent à zéro, et après avoir vérifié ses observations par des expériences sur des singes, *M. Gabritschewsky* a conclu que la disparition de ces spirilles est surtout due à ce que le plasma se charge pendant la crise de substances bactéricides. L'immunité naturelle des animaux réfractaires (le cobaye) dépend aussi, selon *M. Gabritschewsky*, de la formation rapide de substances bactéricides au point de l'inoculation.

Les conclusions de *M. Gabritschewsky* rencontrèrent des objections de la part de M. Metchnikoff[1] et même le fait de la spécificité des matières bactéricides fut mis en doute par le travail de Bardach[2].

Les observations de M. Gabritschewsky établissent la spécificité des substances bactéricides du sérum et la constance de ce phénomène dans la fièvre récurrente : mais elles n'autorisent guère à conclure au rôle de ce facteur dans la pathogénie et le mécanisme de la guérison de cette maladie.

Pour conclure dans ce sens, il aurait fallu noter avec plus de précision le moment de l'apparition des substances bactéricides dans le sérum, la rapidité de leur augmentation et de leur diminution, c'est-à-dire tracer la courbe de leurs variations pendant toute la durée de la maladie.

Ensuite il eût fallu rechercher si ces variations sont sans relation quelconque avec la phagocytose et la leucocytose; il eût donc fallu comparer les courbes des substances bactéricides avec celles de la leucocytose sur les mêmes malades.

L'épidémie de fièvre récurrente à Kasan, dans l'hiver de 1900, nous a fourni des matériaux très riches pour ces recherches. Notre problème consistait :

1° A étudier le mode d'action du sérum spécifique sur les spirilles *in vitro* et dans l'organisme ;

2° A élucider le mode de la disparition des spirilles dans l'organisme des animaux réfractaires ;

3° A chercher s'il n'existe pas un rapport quelconque entre les courbes des substances bactéricides et celles de la leucocytose chez les malades atteints de fièvre récurrente.

1. *Ann. de l'Institut Pasteur*. 1896.
2. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1899.

I

LE PHÉNOMÈNE DE PFEIFFER CHEZ LES SPIRILLES DE LA FIÈVRE RÉCURRENTE

Mettons dans une chambre humide une goutte de sérum contenant des spirilles, provenant du sang d'un malade au second jour du premier ou du deuxième accès.

Dans une autre chambre humide ajoutons, suivant les indications de M. Gabritschewsky, au même sérum contenant des spirilles, une quantité égale de sérum d'un sujet guéri de la fièvre récurrente.

Les spirilles périront dans le dernier cas beaucoup plus vite que dans le premier (l'addition du sérum normal de l'homme n'abrège pas la vie des spirilles). Par conséquent, le sérum des convalescents de la fièvre récurrente est spécifiquement bactéricide pour les spirilles.

Ce fait, établi par Gabritschewsky, fut confirmé par toute une série de savants (Bardach, Zeiliguer, Leventhal, Routkewitch). Dans des essais faits sur un très grand nombre de cas, nous n'avons jamais rencontré d'exception à cette règle.

Si l'on cherche dans l'expérience ci-dessus non seulement le moment de la mort des spirilles, mais aussi la façon dont ils périssent, il est facile d'apercevoir une différence essentielle dans l'un et l'autre cas.

Dans le premier cas, — quand les spirilles provenant, par exemple, d'un malade, pendant les premiers jours du premier ou du deuxième accès, périssent au bout de deux ou trois jours dans le sérum, — ceux-ci, devenus immobiles et morts, se présentent homogènes et brillants, avec un corps uniformément gonflé et une largeur à peu près double de la normale. Ce n'est qu'au bout de plusieurs jours qu'on en voit à l'état de détritus, granuleux et irréguliers.

Lorsque les spirilles périssent à la suite d'addition du sérum spécifique, il apparaît à leur surface un, deux ou trois grains sphériques, homogènes, brillants et ressemblant à des gouttelettes d'une substance colloïdale. Le corps du spirille devient plus mince, perd son éclat primitif et ressemble à un étui vide. Après une journée ou plus, il est quelquefois difficile de déceler

même les traces des corps des spirilles, et même les boules diminuent visiblement, de sorte qu'il est quelquefois impossible d'en retrouver trace.

Si l'on observe ce phénomène dans une chambre humide à 37°, on peut suivre, pas à pas, la transformation graduelle des spirilles. Avec un sérum très riche en substances bactéricides spécifiques, le phénomène se manifeste au bout de quelques minutes. Le spirille ralentit ses mouvements, sur sa surface on voit apparaître, vers son milieu, un petit grain. Les mouvements s'affaiblissent et ne se manifestent que dans les parties terminales du spirille. Quelquefois apparaissent encore deux ou trois grains sur ces parties terminales ; le spirille devient, peu à peu, immobile et plus mince.

Si l'on dépose au bord de la lamelle une goutte de bleu de méthylène, les boules seules se colorent en bleu, chez les spirilles altérés; ceux qui ne le sont pas se colorent aussi avec la même intensité que les boules des spirilles détruits. Ces boules ne sont donc pas autre chose que le contenu extravasé des spirilles.

Évidemment nous avons affaire ici au phénomène de Pfeiffer typique. Sous l'influence des substances spécifiques du sérum, l'enveloppe du microbe subit une altération partielle et se rompt au niveau des points les plus ramollis; la substance protoplasmique sort et prend la forme sphérique.

L'exemple du phénomène de Pfeiffer sur les spirilles confirme de la meilleure façon l'explication donnée à ce phénomène par M. Duclaux dans son *Traité de microbiologie*.

Par analogie avec les phénomènes semblables connus pour d'autres microbes, il nous faut admettre ici une action simultanée sur l'enveloppe du microbe de deux substances : 1° des alexines du sérum (les cytases selon la terminologie de M. Metchnikoff); et 2° des « anticorps » spéciaux, de la substance sensibilisatrice de Bordet ou du « fixateur » du Metchnikoff.

Ces derniers corps supportent le chauffage à 55°-60°, et par conséquent le sérum ne doit pas perdre ses propriétés bactéricides après le chauffage jusqu'à cette température.

Voici en effet quelques expériences qui prouvent qu'il en est bien ainsi.

N° de l'expérience.	ORIGINE DES SPIRILLES	NATURE DU SÉRUM AJOUTÉ	SURVIE des spirilles. à la temp. de la chambre.	SURVIE des spirilles. à 37°.
I.	Au 2e jour du 2e accès.		126 h.	52 h.
	(Le mal. *Pol.*)	+ Sérum bactéricide non chauffé.	5 h.	1 h. 1/2
	—	+ — — ch. 1/2 h. à 56°.	6 h.	1 h. 1/2
	—	+ — — ch. 1/2 h. à 60°.	12 h.	3 h.
	—	+ — normal.	120 h.	44 h.
	—	+ — de cobaye.	180 h.	80 h.
II.	Au 2e jour du 2e accès.		12h 1/2	40 h.
	(Le mal. *Kol.*)	+ Sérum non chauffé.	3 h.	30 min.
	—	+ — chauffé à 55° 1/2 heure.	1 h.	40 min.
	—	+ — — à 57° —	4 h.	40 min.
	—	+ — — à 60° —	10 h.	1 h.
	—	+ — — à 62° —	18h 1/2	2 h.
	—	+ — — à 64° 1/3 heure.	130 h.	56 h.
	—	+ — normal.	120 h.	50 h.
III.	Au 3e jour du 2e accès.		106 h.	34 h.
	(Le mal. *Bou.*)	+ Sérum non chauffé.	2 h.	1/2 h.
	—	+ — chauffé à 62 1/2° 1/2 heure.	25 h.	3 h.
	—	+ — — à 64° 1/2 heure.	108 h.	35 h.
	—	+ — normal.	100 h.	42 h.

Le chauffage du sérum à 55° n'abolit donc pas ses propriétés bactéricides, tout en retardant cependant un peu le moment de la mort des spirilles. Ce retard tient à ce que les cytases du sérum chauffé sont détruites ; seules les alexines du sérum contenant les spirilles sont restées intactes. Les anticorps spécifiques fixateurs supportent le chauffage, même jusqu'à 60°, et restent actifs, comme cela résulte, sans aucun doute, des expériences sur des animaux qui suivent. Le chauffage à 64° détruit complètement ces substances immunisantes.

II

LES SPIRILLES DANS L'ORGANISME DES COBAYES NORMAUX

M. Gabritchewsky a introduit de petites quantités de spirilles (quelques gouttes de sérum additionné de bouillon), dans la cavité péritonéale de cobayes, et n'ayant pu déceler des spirilles dans l'exsudat dans lequel il avait constaté l'accumulation (bien que très insignifiante!) de substances bactéricides, il en a conclu qu'au point d'inoculation se forment les substances bactéricides, qui détruisent les spirilles et donnent au cobaye son immunité naturelle.

Mais il se peut que s'il n'a pas retrouvé de spirilles, c'est simplement parce qu'il en avait mis trop peu. Pour pouvoir observer ce qui se passe avec les spirilles dans la cavité péritonéale, il faut en introduire une assez grande quantité. C'est pourquoi, dans nos inoculations, nous n'employions que des sérums provenant de malades aux derniers jours de l'accès. et contenant des spirilles en quantité suffisante, 7-10 spirilles dans chaque champ microscopique, et nous en injections au moins un demi-centimètre cube dans la cavité péritonéale du cobaye. Dans chaque expérience on préparait avec ce sérum à spirilles une goutte suspendue et que l'on mettait à l'étuve, comme témoin.

Après avoir fait l'injection, on retirait de temps en temps l'exsudat à l'aide de tubes effilés, et on l'examinait à l'état vivant entre lame et lamelle; en même temps on faisait une préparation en mélangeant l'exsudat frais avec de la solution aqueuse du bleu de méthylène [1].

Trois expériences faites dans cette direction donnèrent des résultats tout à fait analogues. 3 à 4 heures après l'injection, ces leucocytes commencent à affluer dans la cavité péritonéale; après 6-7 heures, l'exsudat contient déjà tant de leucocytes qu'il devient très trouble; mais les spirilles conservent leur mobilité. Ce n'est qu'au bout de 8-10 heures que nous pouvions déceler dans des mononucléaires des spirilles phagocytés. On

1. La méthode de la coloration à l'état vivant est très commode pour déceler les spirilles, surtout ceux qui sont en dedans des phagocytes. Les macrophages se colorent très fort dans les préparations fixées. De plus, les spirilles altérés par le fixage ne se colorent pas, et ce sont seulement les boules qui prennent la couleur.

pouvait observer des spirilles vivants encore au second jour et, même par-ci par-là, la phagocytose des spirilles. Dans une des expériences (II), nous avons pu retrouver les spirilles encore vivants 30 heures après l'injection dans la cavité péritonéale.

Dans toutes ces expériences, nous ne trouvions en dehors des cellules que les spirilles mobiles et vivants, et, en colorant nos préparations, nous ne pouvions jamais déceler des spirilles altérés par le phénomène de Pfeiffer. Nous avons pu trouver des spirilles vivants encore après 24 heures et, dans une, même après 30 heures ; après l'injection de spirilles dans le tissu sous-cutané, nous avons pu observer la même vitalité des microbes, alors que, dans les préparations-témoins, en dehors de l'organisme, les spirilles périrent dans deux expériences après 7 heures et dans la troisième après 4 heures.

Par conséquent, les substances spirillicides ne se forment pas au point d'inoculation, mais les spirilles périssent en vertu d'une lente phagocytose. — L'exsudat retiré au niveau de l'inoculation, additionné de spirilles, n'abrégeait pas non plus leur vie, comparativement avec les préparations-témoins. Le sérum des cobayes inoculés ne manifeste aucune propriété bactéricide ni pendant l'expérience, ni le lendemain de l'inoculation.

Nous n'avons pu constater la présence des substances bactéricides que dans le sérum des cobayes ayant reçu deux injections successives à un intervalle de 24 heures dans la cavité péritonéale, et leur apparition n'a eu lieu que 72 heures après la dernière injection. Un tel sérum abrégeait de 24 heures la vie des spirilles, en comparaison avec les témoins ; ces derniers périssaient après 70 heures, tandis qu'après l'addition du sérum examiné, ils périssaient en 50 heures.

Or, les substances bactéricides se forment non pas au point de l'inoculation, mais dans le sang, et ce n'est qu'après quelque temps, lorsque les spirilles sont atteints par la phagocytose.

III

LES SPIRILLES DANS L'ORGANISME DES ANIMAUX IMMUNISÉS. — LES RAPPORTS ENTRE LES LEUCOCYTES ET LES SUBSTANCES IMMUNISANTES

Après avoir étudié le mode de réaction chez les animaux

réfractaires aux spirilles, nous avons fait quelques expériences avec des cobayes, immunisés contre les spirilles : 1° par des injections sous-cutanées successives du sérum contenant des spirilles (immunité active : deux expériences); 2° par des injections sous-cutanées du sérum des convalescents (immunité passive : six expériences).

Dans trois expériences les cobayes reçurent, 24 heures avant l'injection des spirilles, un demi-centimètre cube de sérum immunisant; dans trois autres, 48 heures avant. Ainsi, dans un cas 24 heures, dans un autre cas 48 heures après l'injection de sérum, nous avons introduit dans la cavité péritonéale des animaux un 1/2-3/4 c. c. de sérum des malades, contenant des spirilles.

Les résultats de toutes ces expériences sur des animaux immunisés soit passivement, soit activement, sont complètement concordants. Déjà après 10-15 minutes, on trouvait dans l'exsudat de la cavité péritonéale des spirilles immobiles ; mais les spirilles mobiles étaient encore plus fréquents; après 20 minutes, 40 à 50 au plus, il était déjà impossible de déceler des spirilles mobiles. Si l'on observe les altérations que subissent les spirilles dans l'exsudat, à l'état vivant, ainsi que dans des préparations colorées, il est facile d'apercevoir que les spirilles se réunissent en petits amas, s'agglutinent et subissent une dégénération selon le type du phénomène de Pfeiffer. Ces altérations sont tout à fait analogues à celles que l'on observe *in vitro* après l'addition du sérum immunisant aux spirilles, et que nous avons décrites dans le chapitre premier.

L'afflux des leucocytes dans la cavité péritonéale ne commence que 1/2-2 heures après l'inoculation des spirilles, c'est-à-dire quand ces spirilles avaient déjà péri en dehors des cellules. Sur des préparations colorées avec du bleu de méthylène, on pouvait déceler dans quelques polynucléaires de petites boules colorées, analogues à celles qui se forment aux dépens des spirilles, comme nous l'avons décrit plus haut.

En continuant l'observation, on voit après 5-7 heures apparaître dans la cavité péritonéale des cellules endothéliales desquamées — les grands mononucléaires. Quelques-unes d'entre elles, si on les examine à l'état vivant, contiennent de grandes vacuoles sphériques, remplies d'une substance trouble et gra-

nulée[1]. Si l'on ajoute à ces préparations en goutte suspendue du bleu de méthylène, au bout de quelques minutes apparaissent sous les yeux de l'expérimentateur, dans ces vacuoles, des spirilles colorés en bleu intense. Le noyau de la cellule est très faiblement coloré, le corps de la cellule ne prend presque pas la couleur. Les spirilles conservent quelquefois leur forme sur ces préparations; dans d'autres cas on ne voit qu'un détritus granuleux. Il faut remarquer de suite que les spirilles, autant que l'on peut en juger d'après la coloration, ont été englobés par les cellules d'endothélium avant d'avoir subi le phénomène de Pfeiffer, parce que, dans ce dernier cas, ils n'eussent pas pris la couleur. Évidemment, ils ont été englobés vivants ou au moins inaltérés et ont succombé en dedans des macrophages, par suite d'un autre genre d'altération, différent de celui auquel succombe le spirille sous l'influence de l'action extracellulaire simultanée des anticorps spécifiques et des alexines.

Si l'on injecte 1/2 c. c. de sérum contenant des spirilles sous la peau de deux cobayes, dont un est immunisé et l'autre est neuf, on peut observer chez ces deux cobayes, après 20 heures, des phénomènes bien différents au point de l'inoculation : chez le cobaye immunisé on constate une infiltration insignifiante et un œdème à peine visible, tandis que chez le témoin l'œdème est très grand et il s'étend loin du point de l'inoculation.

Chez le témoin, on trouve dans l'exsudat des spirilles libres et mobiles; chez le cobaye immunisé on ne trouve de spirilles qu'à l'intérieur des macrophages. Mais nous n'avons pu, dans aucune de nos trois expériences, chez aucun cobaye, déceler des spirilles détruits en dehors des cellules.

Ainsi la destruction extracellulaire des spirilles, de même que celle des vibrions cholériques, a lieu chez les animaux immunisés dans des cavités contenant des alexines libres, mais on ne l'observe jamais dans le tissu sous-cutané, où l'organisme ne réagit que par la phagocytose.

En étudiant comment le sérum se comporte vis-à-vis de la chaleur, nous avons pu nous convaincre que les altérations

1. Ces cellules d'endothélium vacuolisées ressemblent beaucoup, à en juger par la description, aux cellules vacuolisées de la rate, qu'a observées Contacusène dans l'infection spirillique des oiseaux; ces cellules contenaient aussi des spirilles dans leurs vacuoles. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.)

ci-dessus décrites, des spirilles dans la cavité péritonéale, s'observent également chez des cobayes, qui avaient reçu du sérum préalablement chauffé à 55° pendant une 1/2 heure, et même à 60° pendant 1/4-1/2 heure.

Quoique les expériences dans l'organisme démontrent que, lorsqu'on injecte des spirilles dans la cavité péritonéale, la substance bactéricide s'y trouve à l'état libre et agit directement sur les spirilles, tout de même il est possible que cette substance devienne libre par suite de la leucolyse qui se fait toujours dans la cavité péritonéale, quand on y introduit des substances étrangères.

Mais si l'on prend une goutte de l'exsudat de la cavité péritonéale du cobaye immunisé, et si, après avoir ajouté une très petite quantité de sérum contenant des spirilles, on l'examine aussitôt au microscope dans une chambre humide à 37°, on ne peut déceler nulle part la destruction des leucocytes, qui s'y trouvent en très petit nombre et sont représentés surtout par les cellules desquamées d'endothélium.

Cependant dans ces préparations, là où il est impossible de trouver des leucocytes, on peut observer bien vite (dans 5-10 minutes) que les spirilles cessent de se mouvoir et commencent bientôt à se détruire.

Cette expérience démontre, sans aucun doute, que la substance fixatrice (la substance immunisante) existe à l'état libre dans la cavité péritonéale. Nous ne pouvons pas en dire autant des cytases ou des alexines, parce que le sérum qui renferme les spirilles en contient toujours.

Nous soulignons tout particulièrement les expériences ci-dessus décrites, parce qu'elles nous donnent la clef des expériences qui suivent.

M. Metchnikoff a démontré, pour le vibrion cholérique, que le phénomène de Pfeiffer n'a pas lieu chez des cobayes immunisés, si on a préalablement produit une leucocytose dans la cavité péritonéale par une injection du bouillon ; dans ce cas, on n'observe qu'une phagocytose bien marquée.

On obtient des résultats analogues aussi dans les expériences avec les spirilles. — Nous injectons à deux cobayes, sous la peau, un 1/2 ou 1/4 c. c. de sérum d'un malade, guéri de la fièvre récurrente; après 24 heures un de ces cobayes reçoit dans

la cavité péritonéale 3 c. c. de bouillon ; l'autre sert de témoin ; après 24 heures encore, c'est-à-dire 48 heures après l'immunisation, on injecte à chacun des deux cobayes, dans la cavité péritonéale, un 1/2 c. c. de sérum, contenant une grande quantité de spirilles.

Trois expériences, faites de cette manière, donnèrent les résultats suivants : chez les cobayes qui n'ont pas reçu de bouillon, les spirilles périrent entièrement dans la cavité péritonéale en dehors des cellules par le phénomène de Pfeiffer, en 30-40 minutes au plus. Chez des cobayes injectés avec du bouillon, on n'observe pas de pareilles altérations. Dans l'exsudat péritonéal après une heure, ainsi qu'après 3, 4, 5 heures, nous trouvons des spirilles mobiles et vivants au milieu d'une grande quantité de leucocytes. Ce n'est qu'après 8-10 heures que les spirilles disparaissent complètement de la cavité péritonale : au moins, on n'en trouvait que très difficilement sur les préparations. Après 24 heures, il était impossible de les déceler.

En colorant à l'état vivant l'exsudat péritonéal, il nous était impossible de découvrir des spirilles altérés par le phénomène de Pfeiffer. Mais dans les premières portions de l'exsudat ainsi que dans les suivantes, jusqu'au moment de la disparition complète des spirilles, nous observions toujours, sur les préparations colorées au bleu de méthylène, la phagocytose des spirilles. Si nous ajoutons à une goutte d'exsudat, prélevé chez un cobaye immunisé et contenant des leucocytes en grand nombre, un peu de sérum avec des spirilles (par conséquent aussi les cytases), nous n'observons jamais (contrairement aux expériences témoin avec de l'exsudat sans leucocytes) des altérations des spirilles par le phénomène de Pfeiffer.

L'absence du phénomène de Pfeiffer s'observe aussi dans le cas où, une demi-heure après l'injection des spirilles dans la cavité péritonéale d'un cobaye immunisé et préparé avec du bouillon, on retire un exsudat riche en leucocytes et en spirilles, et que l'on ajoute *in vitro* une quantité égale de sérum de cobaye neuf qui apporte aussi des cytases. On n'observe pas non plus dans ce cas la destruction des spirilles, ceux-ci restent mobiles.

Dans toutes ces expériences, soit dans la cavité péritonéale, soit *in vitro*, à côté des spirilles se trouvaient aussi des cytases :

dans les premières expériences celles du sérum humain, dans les dernières celles du sérum de cobaye, et si les spirilles étaient influencés par les substances immunisantes (fixatrices) libres, ils auraient dû, comme cela résulte des expériences précédentes, succomber à l'action des substances bactéricides et donner le phénomène de Pfeiffer.

Or. la substance immunisante libre (le fixateur) n'existe pas dans la cavité péritonéale en présence des leucocytes, ou du moins elle existe en quantité trop petite pour manifester son action sur les microbes.

Que sont donc devenues les substances immunisantes de la cavité péritonéale des cobayes, qui ont été constatées avant l'injection du bouillon?

On trouve la réponse à cette question dans l'expérience suivante: on injecte à deux cobayes A et B, sous la peau, un demi-centimètre cube de sérum immunisant; 24 heures après on injecte au cobaye B. et encore à un cobaye neuf C, dans la cavité péritonéale, 3 c. c. de bouillon.

Le jour suivant, on trouve chez les cobayes B et C, dans la cavité péritonéale, une leucocytose bien prononcée. Si l'on prend à présent une gouttelette de l'exsudat des cobayes A et B, et si on y ajoute des spirilles *in vitro*, on constate facilement que le phénomène de Pfeiffer n'a lieu que dans l'exsudat du cobaye A, qui n'a pas reçu de bouillon.

Lorsqu'après avoir sacrifié les cobayes B et C, on recueille l'exsudat de la cavité péritonéale de ces cobayes au moyen de tubes effilés, et que l'on y ajoute une quantité très faible de sang d'un cobaye neuf, pour obtenir la coagulation, on a, au bout de 48 ou 72 heures dans les tubes, qu'on conserve scellés dans un endroit frais, de petites quantités de sérum, provenant des leucocytes du cobaye B (qui a reçu le sérum) et du cobaye C, neuf.

Avec ces sérums on peut faire des expériences sur les spirilles *in vitro*. *Or, ces expériences montrent que seul le sérum du cobaye B. à savoir le sérum provenant de la destruction des leucocytes immunisés, donne le phénomène de Pfeiffer*. Le sérum des leucocytes du cobaye C (neuf) ne manifeste aucun pouvoir bactéricide.

Évidemment, les substances immunisantes qui existaient chez le cobaye et dans la cavité péritonéale à l'état libre ont été englobées chez le cobaye B par les leucocytes, et c'est pourquoi on ne trouve pas,

dans le dernier cas, le phénomène de Pfeiffer dans la cavité péritonéale. Pendant la coagulation, ces substances s'échappent de nouveau du protoplasma des leucocytes et deviennent libres dans le sérum.

On peut donc constater dans le protoplasma des leucocytes d'un animal immunisé la présence d'une philocytase (ou fixateur) spécifique. Voyons, à présent, si ces leucocytes n'ont pas acquis des propriétés nouvelles (comparativement aux leucocytes normaux) vis-à-vis des spirilles.

Nous avons vu plus haut que, après l'injection des spirilles dans la cavité péritonéale de cobaye neuf, ces derniers sont englobés par les phagocytes, mais la phagocytose apparaît bien tardivement et évolue très lentement ; si l'animal ne s'infecte pas par ces microbes, c'est parce que les spirilles se développent très difficilement dans des milieux autres que l'organisme de l'homme et du singe, et qu'une phagocytose même très faible suffit pour les détruire.

La phagocytose ne marche pas plus vite dans un péritoine préparé. L'expérience montre que, dans ce cas aussi, les spirilles qui se trouvent dans le plus proche voisinage des leucocytes ne disparaissent pas plus vite de la cavité péritonéale que chez le témoin ; il a été possible ce les retrouver encore 24 heures après l'expérience. Tandis que si, au lieu des spirilles vivants, on injecte des spirilles tués par le chauffage à 50-55° C., ils sont englobés par les leucocytes en quelques minutes.

L'expérience suivante *in vitro* démontre cependant que la mobilité des spirilles n'est pas la seule cause qui empêche les leucocytes de les englober. Si on ajoute à une goutte d'un exsudat, riche en leucocytes, de cobaye neuf, une quantité très petite de sérum contenant des spirilles, et si on examine la préparation au microscope dans une chambre chauffée, ce n'est que très rarement que l'on observe la phagocytose des spirilles vivants. Les spirilles restent souvent bien longtemps sur la même place, accolés à une hématie ; quelquefois on trouve dans le voisinage un leucocyte, sans que celui-ci tende ses pseudopodes dans la direction du spirille. La conduite du leucocyte apparaît encore plus étrange lorsque le spirille s'entortille, pendant ses mouvements, dans les pseudopodes d'un leucocyte en mouvement, et se trouve de la sorte quelque temps (1 ou

2 minutes) en contact immédiat avec le leucocyte. Au lieu d'englober le spirille, ce qu'aurait fait le leucocyte avec tout autre corps étranger, il retire ses pseudopodes et change de place. Das les mêmes préparations, on pouvait quelquefois observer la phagocytose des hématies de l'homme, si ces dernières étaient par hasard injectées avec le sérum et les spirilles.

Évidemment la plupart des leucocytes du cobaye normal manifeste une chimiotaxie négative envers les spirilles vivants.

Comme il ressort des expériences précédentes, on n'observe pas chez des cobayes immunisés, préparés avec du bouillon, de destruction extracellulaire des spirilles dans la cavité péritonéale ; la phagocytose commence immédiatement après l'injection des spirilles, et s'opère beaucoup plus énergiquement, toutes conditions égales d'ailleurs, que chez le cobaye témoin.

Le changement de la chimiotaxie chez des cobayes immunisés apparaît encore d'une manière beaucoup plus démonstrative dans des expériences *in vitro*.

Si l'on ajoute à un exsudat péritonéal du cobaye immunisé (chez lequel on ne peut pas, comme le montrent les expériences, découvrir la présence de la philocytase dans le plasma) du sérum contenant des spirilles, et si l'on examine la préparation *in vitro*, sur une table chauffante, on voit que la phagocytose des spirilles mobiles et vivants commence aussitôt et dure pendant toute l'expérience, jusqu'au moment — généralement après 3-4 heures — où les leucocytes perdent la capacité de se mouvoir.

Le même phénomène de chimiotaxie positive des leucocytes s'observe aussi *in vitro*, si l'on examine, dans une chambre humide chauffée, une goutte d'exsudat provenant du cobaye immunisé et préparé avec du bouillon, auquel on vient injecter les spirilles dans la cavité péritonéale ; on voit alors dans cette goutte d'exsudat le même phénomène de phagocytose, qui s'observe dans l'exsudat entier dans la cavité péritonéale du cobaye.

Si on colore[1] cet exsudat sur la platine chauffante, ou bien aussitôt qu'il est retiré de la cavité péritonéale de cobaye, on constate que, dans la plupart des cas, ce sont les mononucléaires qui englobent les spirilles.

En comparant les résultats de ces expériences avec celles

1. Le meilleur mode de coloration consiste à ajouter directement sous la lamelle une goutte d'une solution faible du bleu de méthylène.

faites avec les mêmes spirilles, mais sur des cobayes neufs, il est impossible de ne pas en conclure que, après l'immunisation, les leucocytes acquièrent la propriété nouvelle qui est la chimiotaxie positive, qu'ils ne possédaient pas antérieurement.

Les expériences, ci-dessus décrites, démontrent de l'autre côté que dans le protoplasma de ces leucocytes immunisés, qui manifestent une chimiotaxie positive envers le microbe, se trouve une substance immunisante — la philocytase — qui possède une affinité chimique spécifique vis-à-vis du microbe correspondant. Il est bien possible que ces deux phénomènes soient liés entre eux : la présence dans le protoplasma du leucocyte d'une substance chimique, possédant une affinité spécifique pour l'objet de la phagocytose, constitue, à ce qu'il paraît, la cause du phénomène biologique de la chimiotaxie spécifique du leucocyte. Dans une pareille corrélation entre le microbe, la philocytase et le leucocyte. — la philocytase (substance immunisante) représente la véritable substance stimulante des leucocytes dans le sens de M. Metchnikoff[1].

IV

LES COURBES EXPRIMANT LA QUANTITÉ DES SUBSTANCES IMMUNISANTES SPÉCIFIQUES DANS L'ORGANISME DES MALADES ATTEINTS DE FIÈVRE RÉCURRENTE ET LEUR RAPPORT AVEC LES COURBES DE LEUCOCYTOSE DANS CETTE MALADIE

Pour juger du rôle des substances immunisantes spécifiques, ci-dessus décrites, dans la guérison de la fièvre récurrente, il est avant tout nécessaire de chercher comment elles se comportent aux diverses périodes de la maladie.

M. Gabritschewsky a démontré que les propriétés bactéricides du sérum n'apparaissent que pendant l'accès, atteignent leur plus grande intensité à sa fin pour diminuer avant l'accès suivant.

Mais pour juger de la constance et de la régularité de ce phénomène, il faut comparer les courbes de plusieurs malades

1. Je ne veux pas du tout affirmer que tel est toujours le mode d'action de la philocytase dans les phénomènes de la phagocytose. Au contraire, si l'on prend comme objet de l'expérience les hématies, il est facile de voir que le phénomène de la chimiotaxie positive avec phagocytose, peut être déterminé par l'action de la philocytase sur les leucocytes ainsi que par son action immédiate et exclusive sur les hématies. Cette question fera l'objet d'une prochaine publication.

et trouver, ce qui est fort important, pour chaque jour pendant toute la durée de la maladie, des coefficients comparatifs du pouvoir bactéricide *in vitro*. C'est ce qui manque précisément dans le travail de M. Gabritschewsky [1].

Ce savant a proposé d'exprimer le pouvoir bactéricide du sérum par le rapport entre 160 heures (le temps moyen de 4 observations, nécessaire pour déterminer la mort des spirilles, quand on ajoute du sérum d'un homme sain), et le nombre d'heures nécessaire pour que les spirilles périssent quand on leur ajoute une quantité égale du sérum examiné. L'auteur appelle ce rapport coefficient de pouvoir bactéricide.

Mais, comme cela découle des données de M. Gabritschewsky lui-même, ainsi que de nos propres expériences, le chiffre de 160 heures, quoique présentant la moyenne exacte des observations de M. Gabritschewsky, diffère trop des chiffres extrêmes que l'on peut observer et, par conséquent, il est trop loin de la vérité.

La deuxième et la principale source d'erreurs, lorsqu'il s'agit d'examens quotidiens du pouvoir bactéricide du sérum, c'est l'absence d'une unité constante de comparaison, puisque, faute de culture des spirilles, on est obligé d'expérimenter avec des spirilles d'origine variable. Or, la vitalité des spirilles, comme nous avons pu nous en assurer sur un grand nombre d'expériences faites dans cet ordre d'idées, diffère tellement d'un sujet à l'autre, et suivant les différentes périodes de la maladie (de 300 jusqu'à 30 heures), que les coefficients basés sur des tels chiffres sont tout à fait accidentels et non comparables. En d'autres termes, faute de cultures des spirilles, il faut renoncer entièrement à la définition du coefficient absolu de pouvoir bactéricide.

Mais les coefficients absolus ne sont pas indispensables pour notre but; il suffit qu'ils soient comparables, ce qui est facile à obtenir. Pour cela, les coefficients doivent être établis de façon que les sérums des divers jours du même malade puissent agir

1. Tous les expérimentateurs qui étudient la fièvre récurrente doivent forcément restreindre le champ de leurs expériences, par suite du petit nombre des malades et de la courte durée de l'épidémie. C'est pourquoi tous les auteurs — et nous-même aussi bien que les autres — sont obligés de laisser inévitablement certaines questions ouvertes.

sur les mêmes spirilles; la durée de vie de ces derniers dans leur sérum servira d'unité de comparaison.

Pour avoir, dans toutes les courbes aussi, des valeurs absolues des coefficients quelque peu comparables, nous prélevions dans toutes les expériences les spirilles chez les malades au second jour du second accès [1].

L'ordre de l'expérience était le suivant :

Chaque jour, on comptait les leucocytes chez le malade [2]. Chez le même malade on retirait chaque jour, en faisant une piqûre profonde du doigt, 1 1/2 à 2 c. c. du sang dans des tubes effilés, puis on recueillait le sérum dans un autre tube effilé que l'on conservait, après l'avoir scellé, dans un endroit frais. Nos expériences nous démontrent que les propriétés bactéricides du sérum ainsi conservé ne s'affaiblissent pas même après 2 mois 1/2; par conséquent, on ne peut pas s'attendre à voir des oscillations dans la force du sérum pendant le temps que dure l'expérience.

Nous avons fait de la sorte, pendant toute la durée de la maladie et quelquefois même quelques jours après la guérison, une provision de petites portions de sérum, qui correspondaient à chaque journée de la maladie, après quoi on examinait tous les sérums simultanément vis-à-vis des mêmes spirilles, que l'on prenait chez un malade quelconque au second jour du 2e accès.

L'expérience fut réalisée selon la méthode de M. Gabritchewsky.

On place sur une lame stérilisée, à l'aide de tubes effilés du même calibre, deux gouttes voisines; l'une de sérum avec des spirilles, et l'autre de sérum à examiner; on en fait un mélange homogène et, après avoir recouvert d'une lamelle, on la borde avec de la cire. Comme témoin de comparaison, nous avons une préparation de ces mêmes spirilles, non additionnés d'un sérum étranger. Dans quelques cas on faisait l'expérience à la température de la chambre et aussi à celle de l'étuve. Dans le premier cas on examinait les préparations toutes les 2-3 heures, dans l'autre cas toutes les demi-heures, et les préparations, qui

1. Les spirilles du 2e jour du 2e accès restent vivants dans le même sérum *in vitro* de 120 jusqu'à 160 heures.

2. Pour éviter la leucocytose digestive, on faisait le calcul toujours avant le dîner (à 10-12 heures) et, pour éviter les erreurs subjectives de l'observation, tous les calculs furent exécutés par le même expérimentateur (le Dr Melkich), à l'aide de l'appareil Thoma-Zeiss selon la méthode de Thoma.

correspondaient aux jours ayant présenté un pouvoir bactéricide fort, furent contrôlées tous les quarts d'heure.

L'expérience à l'étuve marche beaucoup plus vite. La réaction sur le pouvoir bactéricide est plus sensible, et les coefficients sont un peu plus élevés, mais leur rapport reste à peu près le même qu'à la température de la chambre.

Ce contrôle nous permet d'établir aussi les coefficients pour les sérums, dans lesquels la destruction des spirilles a lieu la nuit (entre minuit, la dernière observation, et 10 heures du matin, la première).

Si l'on remplit toutes ces conditions, il est possible d'obtenir des coefficients qui nous semblent être bien près de la vérité,

Ayant fait toutes ces observations sur un malade, nous obtenons pour tout le cycle de la maladie des données quotidiennes suivantes : 1° la température; 2° le nombre des leucocytes dans 1 millimètre cube du sang; 3° le coefficient du pouvoir bactéricide. Si l'on porte toutes ces données sur le même tableau, on obtient des courbes faciles à comparer entre elles [1].

En tout nous avions 19 malades, chez lesquels nous avons compté les leucocytes et chez lesquels nous avons déterminé le pouvoir bactéricide tous les jours. En plus de ces malades, nous avons obtenu des courbes du pouvoir bactéricide seul, chez 25 malades.

Comme on voit d'après les courbes, la réaction leucocytaire dans le sang pendant la fièvre récurrente est très prononcée et revêt un caractère tout particulier que l'on ne rencontre dans aucune autre infection. Cela est tout à fait naturel si l'on tient compte que l'agent d'infection lui-même se trouve dans le sang. Sous ce rapport, la fièvre récurrente justifie complètement l'expression : « Haemitis » introduite par M. Metchnikoff dans la pathologie du sang.

Conformément aux observations de Ouskoff [2], nos études montrent que les oscillations de la courbe leucocytaire se font

1. En tout nous avons obtenu de telles courbes chez 19 malades, dont nous ne citons dans ce travail que 4, parce qu'elles sont tout à fait analogues aux autres. On trouvera les chiffres détaillés de la bactéricidité, du nombre des leucocytes, etc., sur lesquels sont établies nos courbes, dans la thèse du Dr Myelkich: *Contribution à l'étude de la pathogénie du typhus récurrent*, qui vient de paraître.

2. *Archives des Sciences biologiques*, 1883.

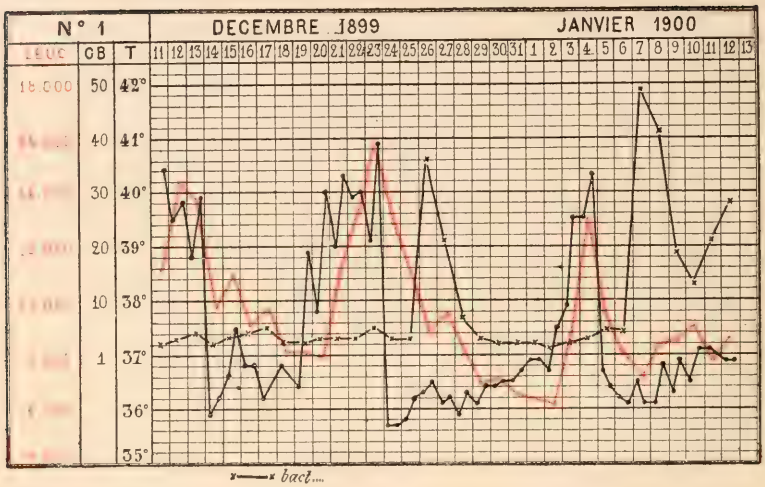
entièrement aux dépens des polynucléaires. Les lymphocytes ne participent pas du tout à cette réaction.

Mais si l'on compte séparément les mononucléaires, et si l'on calcule surtout par rapport au nombre total, il est facile de se convaincre que les mononucléaires aussi, de même que les polynucléaires, interviennent activement dans la pathogénie de la fièvre récurrente. Ils fournissent une courbe à oscillations moins étendues, mais ressemblant à celle des polynucléaires; mais cette courbe, dans sa marche (l'accroissement et la chute), est en retard d'un ou deux jours comparativement avec celle des polynucléaires, elle a l'air de suivre cette dernière. Ce fait justifie encore plus l'expression *Haemitis*, parce qu'il établit aussi de la part de la réaction des mononucléaires l'analogie avec l'inflammation.

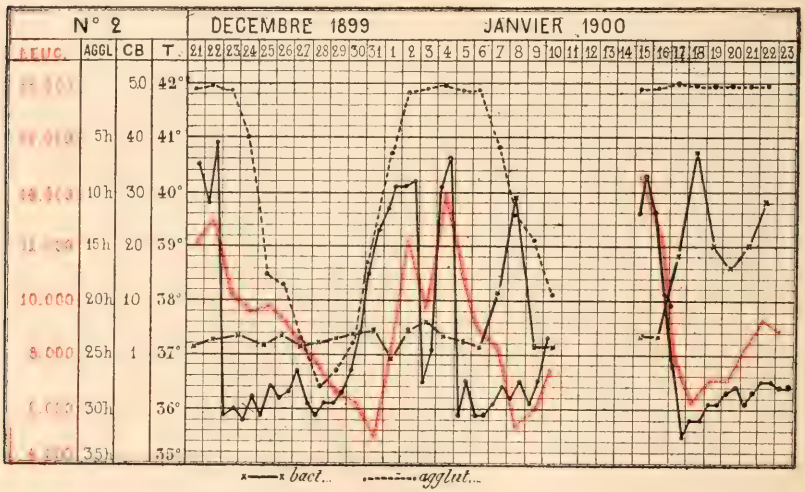
Depuis le travail classique de M. Metchnikoff sur la fièvre récurrente, qui fut confirmé par une série d'autres études (Soudakewitch, Iwanof, Bardach), on considère les polynucléaires comme les agents principaux de la destruction des spirilles. Comme il ressort de l'examen des courbes, la chute des polynucléaires correspond à la période de la crise phagocytaire des spirilles. En ne consultant que la courbe leucocytaire, nous pouvons conclure qu'au fur et à mesure que l'organisme s'immunise, la réaction phagocytaire se perfectionne. Tandis qu'après le premier accès le nombre de leucocytes tombe assez lentement, alors que l'on constate une destruction graduelle de la source d'irritation (les spirilles dans la rate), la même courbe tombe plus rapidement après le second accès et encore plus rapidement après le troisième. Après la destruction complète des spirilles, la courbe de la leucocytose reprend son caractère normal et ne donne plus d'oscillations.

Le même caractère typique et régulier appartient aussi à la courbe qui montre l'accroissement des substances immunisantes dans l'organisme[1]. Comme exemple le plus typique que l'on rencontre le plus fréquemment, nous pouvons citer celui désigné sous le numéro 1.

1. Comme la destruction plus ou moins rapide des spirilles, selon le type du phénomène de Pfeiffer, dépend, comme cela était démontré plus haut, de la quantité relative des substances immunisantes spécifiques (philocytases) dans le mélange, la courbe représentant les variations du pouvoir bactéricide sert en même temps d'indicateur de la richesse relative du sérum en substances immunisantes.

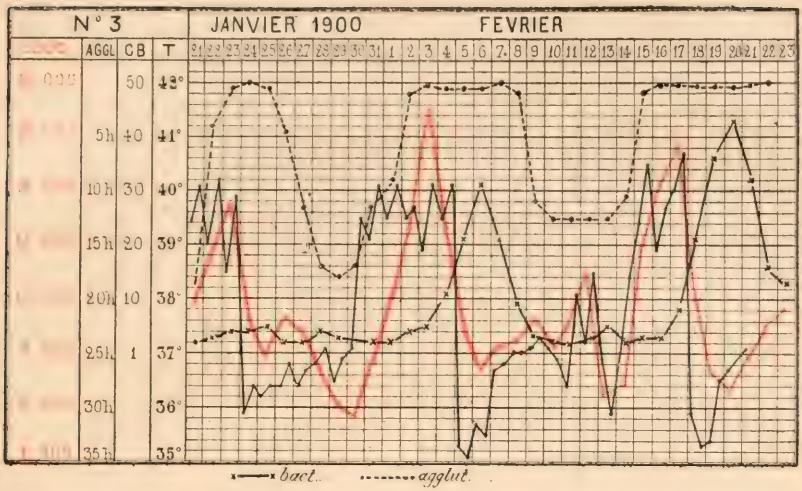


N.-B. — Dans ces tracés, la ligne continue est la ligne des températures, la ligne à traits est celle du pouvoir bactéricide (c. *b.*). La ligne rouge est celle de la leucocytose. La ligne pointillée est celle de l'agglutination.

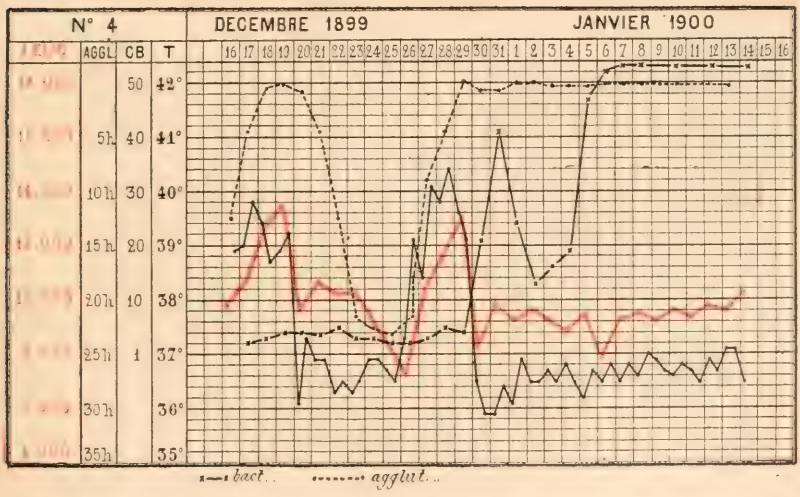


N.-B. — Le malade avait quitté l'hôpital du 10 au 15 janvier.

Comme le montrent les courbes, le coefficient du pouvoir bactéricide pendant les derniers jours du premier accès, et pendant la première apyrexie qui suit l'accès, n'atteint jamais des chiffres élevés : il oscille entre 1 et 3, et n'arrive que très rarement (aux jours de l'apyrexie) jusqu'à 4.



Pendant le second et le troisième accès, dans la majorité des cas, conformément aux observations de Gabritschewsky, le coeffi-



cient tombe à des chiffres bas (près de 1), quoiqu'on rencontre aussi des exceptions à cette règle; comme le montre la courbe n° 2, l'accès peut avoir lieu aussi quand le sérum contient des substances immunisantes en faible quantité. Dans deux autres cas, nous avons pu voir l'accès se produire au moment où le coefficient du pouvoir bactéricide était de 2-3.

Mais le fait qui mérite le plus d'attirer notre attention, c'est l'accroissement rapide du coefficient bactéricide après le deuxième accès et surtout après le troisième.

Il faut noter ce fait très caractéristique, que le point le plus élevé de la courbe bactéricide ne correspond pas au jour de la crise ou au jour qui la suit, mais presque toujours au troisième jour après la crise.

Ensuite, au cours de la seconde apyrexie, le pouvoir bactéricide, *resp.* la quantité des substances immunisantes spécifiques, tombe rapidement dans les deux jours suivants en atteignant des chiffres relativement bas jusqu'au troisième accès.

Après le troisième ou, pour mieux dire, le dernier accès, le coefficient du pouvoir bactéricide atteint, au troisième jour, des chiffres élevés (30-40), quoiqu'il manifeste aussi la tendance à la chute les deux jours suivants; mais il ne tombe jamais à des chiffres bas : après s'être maintenu à des chiffres comparativement élevés (12-15), il s'élève de nouveau, et au 7e ou 8e jour arrive aux chiffres les plus élevés (à peu près 60) et reste ensuite très longtemps, sans présenter des oscillations, à la même hauteur.

Dans un cas, nous avons pu prendre du sang, à de petits intervalles de temps, pendant deux mois après la guérison, et l'examen des sérums nous montra que le coefficient du pouvoir bactéricide restait tout le temps le même, à peu près à 60.

Si la maladie se limite à deux accès, la même constance du coefficient bactéricide s'observe après le deuxième accès (fig. n° 4).

Si l'on compare, sur les tableaux ci-joints, les courbes de la leucocytose et des coefficients de la bactéricidité, il est facile de voir que la teneur du sérum en substances immunisantes ne se trouve pas en rapport direct avec le nombre des leucocytes dans le sang : le sérum d'un sang qui contenait une grande quantité de leucocytes est pauvre en ces substances; par contre leur quantité maxima après les accès coïncide plutôt avec un petit nombre de leucocytes. — Mais aussi la destruction des leucocytes dans le sang (l'hypoleucocytose, produite par la leucolyse) n'est pas non plus la source de ces substances ; leur quantité maxima a lieu après la seconde élévation, aussitôt après le

dernier accès, lorsqu'on n'observe pas d'oscillations marquées au point de vue de la leucocytose.

Et cependant la courbe de la bactéricidité, si l'on prend en considération son élévation rapide et critique, se trouve évidemment dans une relation quelconque avec la courbe de la leucocytose. Les accroissements postcritiques rapides du pouvoir bactéricide suivent les accroissements et les chutes rapides de la leucocytose.

Comme il n'existe à présent aucun doute, que la réaction leucocytaire avant-critique finit par la phagocytose des spirilles, — il est alors évident que les substances immunisantes, qui se trouvent dans le sang après la crise, apparaissent comme le résultat de la digestion intracellulaire des spirilles, comme cela semble avoir lieu en général pour toutes les philocytases étudiées jusqu'à présent. Cette conclusion est tout à fait d'accord avec l'observation, décrite plus haut, sur la formation des substances antispirillaires chez des animaux, immunisés activement contre les spirilles.

Ce lien entre l'accumulation des substances anti-spirillaires et l'hyperleucocytose, *resp.* phagocytose antérieure, est manifeste non seulement dans les accès typiques, mais encore dans des accès dédoublés (fig. n° 2). ainsi que dans des accès qui ne sont pas assez nettement caractérisés, accès larvés (voir. par exemple, sur la fig. 3 entre le deuxième et troisième accès).

Or, comme cela résulte des expériences sur des animaux, et de l'analyse des courbes de la leucocytose et de la bactéricidité, les substances anti-spirillaires spécifiques, étudiées jusqu'à présent, apparaissent quelque temps après la digestion intracellulaire des spirilles.

V

DE L'AGGLUTINATION DES SPIRILLES

Heydenreich [1] a remarqué que les spirilles dans le sang des malades de fièvre récurrente se réunissent quelquefois en dehors de l'organisme en amas plus ou moins grands,

1. *Études histologiques du sang de l'homme dans diverses maladies*, 1875 (en russe).

lesquels, en raison de leur disposition, revêtent la forme étoilée. Des spirilles, réunis en plus ou moins grande quantité en pareils amas, ont été signalés dans des préparations du sang, ainsi que dans des coupes d'organes (*Soudakewitsch* [1]) presque par tous les auteurs qui ont travaillé sur la fièvre récurrente.

Il est très facile d'observer ce phénomène si l'on examine les spirilles dans du sérum en goutte pendante.

Au bout de quelque temps on constate, dans ce cas, d'abord la formation de petits amas de spirilles agglutinés, puis, par suite de soudures nouvelles, il se forme des grands pelotons de spirilles, dont le centre se compose de spirilles entremêlés d'une manière très intime, et sur la périphérie desquels se trouvent les spirilles mobiles et disposés en forme de rayons.

Si l'on prend des observations tous les jours d'une façon régulière, on ne tarde pas à remarquer que ce phénomène arrive plus vite dans les jours proches de la crise, et qu'il n'est pas observé du tout pendant les premiers jours du premier accès. Il ne commence à se manifester qu'au quatrième où au cinquième jour du premier accès. Pendant les jours qui précèdent la crise, par exemple la veille du deuxième et surtout du troisième accès, on observe l'agglutination des spirilles au moment même où l'on fait la préparation.

Ce phénomène, par sa nature, ainsi que par le temps de son apparition chez les malades, est évidemment tout à fait analogue au phénomène d'agglutination, si bien connu.

La même propriété est constatée aussi dans du sérum pendant les jours d'apyrexie, et surtout dans du sérum des convalescents. Si l'on ajoute une goutte de ce sérum à une goutte de sérum contenant des spirilles, provenant d'un malade aux premiers jours du premier accès, (quand les spirilles ne s'agglutinent pas encore dans la préparation témoin), l'agglutination des spirilles commence peu de temps après.

En se servant de la même méthode, à l'aide de laquelle nous avons étudié la puissance bactéricide relative, il est possible de pratiquer simultanément l'examen comparatif de leurs propriétés agglutinantes, si on prend soin de choisir pour l'expérience des spirilles à une période de la maladie, quand ils ne s'agglutinent pas eux-mêmes.

1. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1891.

Si l'on note le moment d'apparition de l'agglutination dans chaque préparation, on peut tracer la courbe des agglutinines pour toute la période de la maladie. On trouvera des courbes pareilles sur les tableaux 2, 3 et 4.

Il résulte de l'examen des courbes que celle de l'agglutination ne marche pas parallèllement à la courbe de la puissance bactéricide : évidemment ces substances sont d'origine différente et de valeur différente au point de vue de la pathogénie de la fièvre récurrente.

Ces substances ne se comportent pas de même sous l'action de la chaleur : c'est ce que montre l'exemple ci-dessous. Nous citons une des expériences avec le sérum d'un convalescent au 21e jour après le troisième accès :

SPIRILLES	SÉRUM	COMMENCEMENT de l'agglutination.	Survie des spirilles	Coefficient de la puissance bactéricide.
Du 4e jour du 2e accès.		Très faible après 9 heures.	40 heures.	
— +	Le s. d'un homme sain (témoin).	Nulle après 9 heures.	50 —	0,8
— +	Le s. bactéric. pas ch.	Complète dans 10 minutes.	1/2 heure.	80
— +	— — chauffé 1/2 h. 62 1/2°,	—	2 heures.	20
— +	Le s. bactéric. chauffé 1/2 h. 64°.	—	56 —	0,7

Or, le chauffage à 64° pendant une demi-heure détruit complètement les substances immunisantes, et n'affaiblit pas du tout l'action des agglutinines.

Par conséquent, si nous voulons exclure de l'expérience le phénomène bactéricide, afin de donner à l'agglutination le temps pour se manifester plus fortement, il suffit de chauffer le sérum jusqu'à 64° et de refaire la même expérience pour comparer les propriétés agglutinantes du sérum. Plusieurs expériences réalisées dans cette direction nous montrèrent que le caractère des courbes ne change pas, c'est-à-dire que la présence des substances bactéricides n'influe pas sur le phénomène de l'aggluti-

nation. Au n° 4 est représentée une de ces courbes, obtenue avec du sérum chauffé à 64°.

Seulement les substances agglutinantes n'apparaissent pas dans le sérum en dehors de l'organisme. Évidemment elles existent et exercent leur influence aussi dans le plasma.

Pendant les jours caractérisés par une notable teneur en agglutinines, on peut observer des spirilles réunis en petits amas dans le sang même, si l'on examine la préparation immédiatement après la prise du sang; on peut observer le même phénomène aussi sur des préparations colorées. Il est vrai qu'ici le phénomène ne se présente pas avec la même netteté, mais cela doit évidemment tenir au mouvement rapide du sang qui empêche l'agglutination des spirilles de se faire dans les grandes veines et d'atteindre les capillaires.

CONCLUSIONS.

On peut considérer comme solidement établis par les expériences ci-dessus exposées les faits suivants :

I. Dans l'organisme des malades atteints de la fièvre récurrente, se forment des substances qui possèdent une affinité spécifique pour les spirilles; ce sont (*a*) des agglutinines et (*b*) des substances immunisantes[1] (fixateurs)

II. Le fixateur, comme le montrent les expériences sur des animaux et l'examen des courbes, apparaît comme résultat de la digestion intracellulaire des spirilles.

III. Le fixateur spécifique combiné à l'alexine (la cytase) du sérum constitue la cause de la destruction des spirilles en dehors de l'organisme *in vitro*; les altérations des spirilles qu'on y observe sont tout à fait analogues à celles du phénomène de Pfeiffer.

IV. La dissolution extracellulaire des spirilles a lieu aussi chez des animaux immunisés dans les régions de l'organisme (la cavité péritonéale), où, simultanément avec le fixateur, peut

1. Il a été prouvé, par une expérience directe, que le sérum des convalescents de la fièvre récurrente contient une substance immunisante. M. Iwanoff a pu, avec un tel sérum, conférer l'immunité aux singes susceptibles à la fièvre récurrente. (Iwanoff, *Sur la question de l'immunité artificielle dans la fièvre récurrente*, 1897 [en russe]).

intervenir aussi la cytase, qui se trouve à l'état libre dans le plasma.

V. S'il n'y a pas d'alexine libre (cavité péritonéale des animaux traités avec du bouillon ou de l'aleuronate, tissu sous-cutané), la destruction extracellulaire des spirilles chez des animaux immunisés ne s'observe pas : les spirilles disparaissent par phagocytose.

VI. La substance immunisante (fixateur) sert d'intermédiaire entre le spirille et le leucocyte, en transformant la chimiotaxie négative du dernier en chimiotaxie positive.

Nous formulons cette dernière proposition sous une forme générale, étant donné qu'il est possible d'admettre deux modes d'action de la substance fixatrice.

1° Les leucocytes absorbent le fixateur; le protoplasme du leucocyte, dont la substance albuminoïde contient la molécule de fixateur, acquiert *ex ipso* l'affinité chimique (propre au fixateur) vis-à-vis de l'objet de la phagocytose; cela se manifeste biologiquement par la réaction phagocytaire.

On peut tirer cette conclusion en se basant sur nos expériences sur les animaux immunisés.

2° Le fixateur, qui se trouve à l'état libre dans le plasma, est fixé sur les spirilles auxquels il communique l'affinité chimique pour le protoplasma des leucocytes : il en résulte le même phénomène, la phagocytose.

Nous considérons cette hypothèse comme admissible, quoique, comme nous l'avons vu, on ne peut pas obtenir le phénomène de Pfeiffer, si l'on fait agir les alexines sur des spirilles, qui se montrent bien phagocytables dans l'organisme des animaux immunisés.

Il est possible que, pour que la phagocytose se manifeste, il suffise à son objet de fixer beaucoup moins de fixateur qu'il n'en faut pour que se manifeste l'action des alexines.

VII. Comme cela résulte de toute une série de recherches faites par les élèves de M. Metchnikoff, le plasma ne contient pas d'alexine à l'état libre ; — que la substance immunisante agisse de l'une, soit d'autre manière, nous ne pouvons pas attendre dans le sang la destruction extracellulaire des spirilles, que l'on observe *in vitro*.

Et en effet personne n'a encore prouvé par une observation

directe la destruction extracellulaire des spirilles dans la fièvre récurrente. La conclusion, formulée dans ce sens par M. Gabritschewsky, n'est basée que sur l'analogie avec la destruction des spirilles *in vitro*, et l'auteur n'a pas tenu compte de l'absence des alexines dans le plasma. Dans nos propres expériences sur le sang avant la crise, dans plus de 50 cas, nous n'avons pas pu trouver une seule fois dans le sang des spirilles détruits ou altérés selon le type du phénomène de Pfeiffer.

VIII. En nous basant sur ce qui précède, nous devons admettre que la crise phagocytaire est déterminée par l'accumulation dans l'organisme, à ce moment donné, d'une quantité suffisante de fixateur, soit que celui-ci soit lié aux leucocytes, soit qu'il se trouve dans le plasma fixé sur les spirilles.

En effet, les courbes montrent que le coefficient du pouvoir bactéricide, au jour de la crise, atteint 2, 3 et même 4. Mais il nous faut l'estimer encore un peu plus haut, si l'on tient compte qu'une partie des substances bactéricides fut dépensée pour la destruction des spirilles qui se trouvaient dans le sérum pris pour l'expérience.

L'expérience directe montre que le sérum contient, à la veille de la crise, une grande quantité de substances immunisantes *resp.* de fixateur, lié aux alexines qui se sont formées dans le sérum.

Déjà au bout d'une heure, 2 ou 3 du plus, à la température de la chambre, on peut voir dans un tel sérum des spirilles altérés à la façon du phénomène de Pfeiffer, et la destruction définitive des spirilles a lieu dans 40 heures, en moyenne, quelquefois même dans 20 heures.

Si l'on note chaque jour le temps pendant lequel les spirilles restent dans le sérum des malades atteints de fièvre récurrente, ce que nous faisions dans tous les cas dans lesquels nous étudions aussi la courbe du pouvoir bactéricide par la méthode décrite plus haut, il nous est facile de nous convaincre que, plus on est près de la crise, plus les spirilles périssent vite *in vitro*. Si l'on envisage les rapports qui existent entre le temps de la destruction des spirilles au second jour du second accès et le temps de leur destruction dans les autres jours des accès, on tobtiendra une série des coefficients montrant l'accroissemen de la force bactéricide du sérum.

Nous pouvions nous convaincre par de telles expériences que ces coefficients, comme on pouvait s'y attendre, sont un peu plus élevés que ceux portés sur nos courbes, quoique la différence ne soit pas considérable ; par exemple : au lieu de 2, on obtient 3 : au lieu de 3, on constate 4 ou 6, mais pas plus.

D'où proviennent alors les substances fixatrices chez les malades de fièvre récurrente, si l'on admet que la phagocytose des spirilles n'a lieu que pendant la crise?

Or, en réalité cette supposition n'est pas tout à fait vraie. Soudakewitch[1] a vu que la phagocytose s'observe non seulement dans la rate, mais aussi dans le sang.

Iwanof[2] put déceler, dans le sang pendant l'accès, des spirilles phagocytés. Après avoir fait une grande provision des préparations du sang de nos malades, nous le colorâmes après la fin de la partie expérimentale de ce travail, et nous pûmes nous convaincre aussi qu'en examinant le sang des malades, même 3 jours avant la crise, il est possible d'y constater des leucocytes ayant englobé des spirilles. Plus on est près de la crise, plus souvent on rencontre ce phénomène de phagocytose.

Certes, on rencontre dans la fièvre récurrente, de même que dans les autres maladies infectieuses, même mortelles, parmi la masse de microbes, des individus plus faibles, qui résistent moins contre la phagocytose ; de même dans chaque organisme, dans la masse de leucocytes, on en trouve qui sont plus adaptés à la phagocytose. Et une fois le procès de la digestion intracellulaire des microbes commencé, il conduit inévitablement à l'accroissement graduel du fixateur jusqu'à ce que ce dernier se trouve accumulé en quantité suffisante pour que la chimiotaxie négative des leucocytes puisse se transformer en chimiotaxie positive et que la crise phagocytaire puisse apparaître.

Et la quantité, comparativement énorme, de fixateur que l'on trouve après la crise n'est que le résultat de la digestion de toute la masse des spirilles, qui se trouvaient dans le sang, et par conséquent ne peut nullement influer sur l'apparition de la crise.

IX. La crise phagocytaire contribue sans doute aussi à l'accumulation des agglutinines : les tableaux des leucocytes, englobant

1. *L. c.*
2. *Centralbl. für Bacteriologie*, 1897.

toute une masse de spirilles, décrits par Metchnikoff et Soudakewitch, s'expliquent facilement si on admet que le leucocyte s'empare à la fois d'un petit amas entier des spirilles agglutinés, et ne les phagocyte pas un par un. Pour ce qui concerne l'accumulation des spirilles dans la rate, où on observe en effet la phagocytose pendant la crise, il faut prendre probablement en considération leur propriété de s'agglutiner.

Si l'on examine comparativement les courbes de la leucocytose, de la bactéricidité et de l'agglutination, il se présente à l'esprit plusieurs questions présentant une grande importance au point de vue de la théorie de l'immunité.

Pourquoi en effet les anti-corps spécifiques après la première crise, *resp.* après la première vaccination, se forment-ils en petite quantité, et pourquoi leur production augmente-t-elle après chaque crise?

Pourquoi disparaissent-ils si vite de l'organisme après les premières crises, en ne lui communiquant qu'une immunité passagère et pourquoi, par contre, se fixent-ils d'une façon permanente dans l'organisme après le dernier accès, en lui communiquant une immunité définitive?

La fièvre récurrente, en comparaison avec d'autres maladies, présente, d'après notre avis, de grands avantages pour résoudre ces questions.

Mais, à notre regret, il nous était impossible d'aborder ces questions, parce que celles-ci se sont présentées à nous à la fin de notre travail, c'est-à-dire après la fin de l'épidémie.

Le présent essai d'étude systématique du rôle des agents chimiques dans le mécanisme de la guérison, *resp.* l'immunité, montre une fois de plus que l'étude du mode d'action de ces facteurs, que l'école humorale considère comme les agents principaux de l'immunité, ne contredit pas du tout la théorie phagocytaire de Metchnikoff, mais au contraire elle lui donne une nouvelle base solide, en écartant toute une série d'objections qui ont été formulées auparavant par l'école humorale.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE FERMENT MANNITIQUE

PAR MM. U. GAYON ET E. DUBOURG

Dans un travail inséré dans ces *Annales* en 1894, nous avons fait connaître un ferment produisant de la mannite aux dépens du lévulose, et présenté une première étude de son action sur le sucre interverti et sur le moût de raisin[1]. Nous complétons aujourd'hui cette étude et nous l'étendons à différents hydrates de carbone des groupes hexoses, saccharoses et pentoses.

I

GÉNÉRALITÉS

Voici d'abord des indications d'ordre général sur la vie du ferment :

1° *Action de la chaleur.* — Pour déterminer la température la plus favorable à son développement, on a fait des cultures comparatives, avec un même liquide nutritif et une même semence, dans des étuves réglées à différents degrés.

Au bout de trois semaines, on a dosé le sucre disparu, la mannite apparue, l'acidité formée, et l'on a obtenu par litre de liquide :

	A 15°	A 25°	A 35°	A 45°
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.
Sucre disparu.....	20,92	21,41	34,19	16,66
Mannite formée.....	12,56	12,88	22,12	11,04
Acidité totale en SO^4H^2.	5,16	5,54	8,50	4,66
— volatile en SO^4H^2.	2,67	2,79	4,62	2,52

Une température de 35° environ est donc celle qui convient le mieux au ferment ; c'est ce qui explique la production de mannite, quand la vendange en cuve atteint ce degré de chaleur.

1. M. Laborde a montré qu'il y a d'autres ferments mannitiques (*Annales de la Brasserie*, I, page 337, 1898) ; mais il n'est question ici que du microbe isolé par nous, à l'état de pureté, en 1894.

Au-dessous de 35°, la vitalité du ferment diminue et devient à peu près nulle au voisinage de zéro; au-dessus de 35°, elle diminue également jusqu'à la mort des cellules. La connaissance de la température mortelle présente un intérêt pratique en œnologie, par exemple pour la pasteurisation des vins menacés de se manniter après décuvaison.

Pour la déterminer, on a rempli une série de petits tubes en verre mince, cylindriques, de 1 millimètre environ de diamètre, avec du liquide en pleine fermentation mannitique; puis, on a chauffé ces tubes, par groupes, dans un bain-marie porté successivement de 55 à 60°. A chaque degré, la température était maintenue constante pendant 2 minutes, et dans ce temps, tous les quarts de minute, on retirait un tube qu'on refroidissait rapidement. Avec le contenu de ces tubes, on a ensemencé une série de matras de culture qui ont été laissés pendant trois semaines dans une étuve à 35°. L'examen microscopique et le dosage de l'acidité ont alors montré que toutes les cultures faites avec du ferment chauffé à 55, 56 et 57 degrés, même pendant deux minutes, avaient donné les mêmes résultats que les cultures témoins : à ces températures, le ferment n'avait été ni tué ni paralysé. Mais dans les cultures faites avec les tubes chauffés à 58, 59 et 60 degrés, l'effet de la chaleur s'est manifesté, s'accentuant avec le degré et la durée de la chauffe. Voici, en effet, la marche de l'acidité dans ces essais :

Temps de chauffe en quarts de minute.	Acidité totale produite par litre. à 58°	à 59°	à 60°
—	—	—	—
	Gr.	Gr.	Gr.
1	6,9	6,9	6,9
2	6,9	6,9	6,9
3	6,9	6,9	6,9
4	6,9	6,9	6,9
5	6,9	6,9	6,4
6	6,4	5,6	4,1
7	4,0	3,5	0,0
8	0,0	0,0	0,0

On voit que le ferment a été tué en 2 minutes à 58° et en 1 minute 3/4 à 60°; mais, avant d'être complètement stérilisé, il a subi un affaiblissement progressif qui s'est traduit par une diminution correspondante dans l'acidité formée.

La même semence, préalablement diluée dans de l'eau stérilisée, pour affaiblir l'acidité du milieu, n'a été tuée qu'à la température de 59° et au-dessus.

Il résulte de là que, pour prévenir la fermentation mannitique dans les vins encore doux ou dans les moûts, il faut les pasteuriser à une température d'au moins 60 degrés.

2° *Action des antiseptiques.* — Les principales substances antiseptiques connues ou préconisées pour la conservation des boissons fermentées ont été essayées, pour la plupart, à des doses de 1/1,000, 1/5,000, et 1/10,000. Comme il fallait s'y attendre, les résultats ont légèrement varié avec la constitution des liquides de culture. Voici, par exemple, ceux qui ont été obtenus avec du bouillon Liebig renfermant 60 grammes de sucre et une acidité de 3 grammes par litre; les chiffres inscrits au tableau indiquent les poids de sucre fermenté dans le même temps :

	Nom de l'antiseptique.	Doses d'antiseptique 1/1000	1/5000	1/10000
		Gr.	Gr.	Gr.
1.	Acide borique	33,3	»	»
2.	Acide arsénieux	0,0	0,0	0,0
3.	Sublimé corrosif	0,0	0,0	0,0
4.	Sous-nitrate de bismuth	0,0	0,0	0,0
5.	Carbonate de bismuth	0,0	0,0	0,0
6.	Sulfate de cuivre	0,0	0,0	8,3
7.	Fluorure d'ammonium	0,0	0,0	3,8
8.	— de potassium	0,0	3,8	4,6
9.	— de sodium	0,0	3,9	6,6
10.	Acide salicylique	0,0	0,0	0,0
11.	Salicylate de soude	0,0	21,8	28,4
12.	Thymol	0,0	2,8	27,7
13.	Naphtol	0,0	29,2	36,5
14.	Abrastol	33,3	»	»
15.	Asaprol	33,3	»	»
16.	Phénol	31,3	37,7	38,3
17.	Salol	33,3	»	»
18.	Tannin	33,3	»	»

Les cultures témoins ont donné, dans les mêmes conditions, de 33 à 38 grammes par litre de sucre fermenté.

On voit que, pour un même milieu, le bouillon Liebig sucré, les substances essayées se sont comportées comme suit :

1° *Substances actives à* 0gr,10 *par litre :*

Acide arsénieux.
Sublimé corrosif.
Sous-nitrate de bismuth.
Carbonate de bismuth.
Acide salicylique.

2° *Substances actives à* 0gr,20 *par litre :*

Sulfate de cuivre.
Fluorure d'ammonium.

3° *Substances actives à* 1 *gramme par litre :*

Fluorure de potassium.
Fluorure de sodium.
Salicylate de soude.
Thymol.
Naphtol.

4° *Substances inactives à* 1 *gramme par litre :*

Acide borique.
Abrastol.
Asaprol.
Phénol.
Salol.
Tannin.

Avec le moût de raisin, le classement s'est trouvé un peu différent. Pour quelques substances, le pouvoir antiseptique a diminué; ainsi, le fluorure de potassium et le naphtol ont été inactifs à la dose de 1/1.000; le fluorure d'ammonium n'a produit d'effet qu'à la dose de 1/1000.

Par contre, pour d'autres substances, le pouvoir antiseptique a augmenté : ainsi, le fluorure de sodium, le salicylate de soude et le thymol ont été efficaces à la dose 2/10000 et le sulfate de cuivre à la dose de 1/1000.

Lorsque la quantité d'antiseptique employée n'est pas suffisante pour enrayer complètement la fermentation, elle peut la ralentir; l'effet est alors proportionnel à la dose, comme le montrent les chiffres trouvés pour les fluorures de potassium et de sodium, le salicylate de soude, le thymol et le naphtol.

D'autres expériences ont montré que l'action d'un antiseptique ne paraît modifiée ni par la proportion ni par l'âge du ferment mannitique, qu'elle est la même s'il est ajouté au moment de l'ensemencement ou au milieu d'une fermentation.

Au point de vue pratique, bien peu de substances sont intéressantes, car les unes sont toxiques et d'autres sont peu actives aux doses susceptibles d'être employées sans altérer l'odeur et le goût du vin.

Il n'y a guère que le sous-nitrate de bismuth dont l'emploi,

aux doses efficaces de 10 à 20 grammes par hectolitre, puisse être considéré comme à peu près sans danger pour la santé publique. A ces doses d'ailleurs, loin de gêner la fermentation alcoolique, il la favorise au contraire [1].

La même remarque s'applique au fluorure d'ammonium, dont l'action favorable sur la levure a été mise en évidence par M. Effront [2].

3° *Influence de l'acidité du milieu.* — L'acidité joue un rôle important dans le développement du ferment mannitique ; une expérience déjà publiée a montré que la quantité de sucre transformé en mannite est exactement en raison inverse de l'acidité primitive, et qu'avec l'acide tartrique, une dose de ce corps, équivalant à 7 grammes environ d'acide sulfurique par litre, empêche toute fermentation.

Aussi les moûts de raisins peu acides donnent-ils facilement des vins mannités, et convient-il, comme l'a préconisé M. Carles [3] de les remonter avec de l'acide tartrique pour assurer la régularité et la pureté de leur vinification.

Les acides n'ont pas tous la même action, et le ferment supporte mieux en général les acides organiques que les acides minéraux, comme le fait voir le tableau suivant, où l'on a exprimé en acide sulfurique les doses au delà desquelles, dans nos expériences, tout développement a cessé :

Acide acétique	12	grammes	par litre.
— malique	12	—	—
— citrique	9	—	—
— lactique	8	—	—
— propionique	7	—	—
— tartrique	7	—	—
— sulfurique	7	—	—
— azotique	5	—	—
— chlorhydrique	3,5		—
— phosphorique	3,5		—

Il semble, d'après ces chiffres, que la totalité des acides fixes et volatils, engendrés pendant la fermentation mannitique, ne puisse pas être sensiblement supérieure à l'équivalent de 12 grammes d'acide sulfurique par litre. En fait, cependant, cette proportion est dépassée dans des liqueurs suffisamment

1. Gayon et Dupetit, *C. R.*, t. CII, page 883, 1886.
2. *Bulletin de la Société chimique* (3), tome V, page 731, 1891.
3. *Feuille vinicole de la Gironde* et *Moniteur vinicole*, juillet 1893.

concentrées; l'apparente contradiction s'explique parce que, dans une culture normale, le ferment vit d'abord dans un milieu à peu près neutre et que ses générations successives s'habituent progressivement aux doses croissantes d'acidité.

Comme un excès d'acidité libre gêne le ferment, il est nécessaire, si l'on veut obtenir la transformation de grandes quantités de sucre, de maintenir une neutralité relative par l'addition de carbonate de chaux.

4° *Influence du milieu de culture.* — Le moût de raisin convenablement dilué constitue un bon milieu de culture; mais on le remplace avec avantage, au point de vue minéral et azoté, par de l'extrait Liebig dissous dans l'eau à la dose de 20 à 30 grammes par litre, ou mieux encore par de l'eau de levure préparée avec 20 à 25 0/0 de levure pressée. Avec le bouillon Liebig sucré, le liquide reste limpide, la fermentation est lente et il ne se dégage en apparence aucun gaz; avec l'eau de levure sucrée au contraire, le liquide est opalin, et quelquefois un peu trouble; la fermentation est plus rapide et il peut se former, comme l'a observé le premier M. Laborde [1], des bulles de gaz et même de la mousse. Ce gaz est de l'acide carbonique qui, dans le premier cas, se diffuse à mesure qu'il se produit, tandis que dans le second cas, il sature le liquide et s'en dégage à la fois par bulles et par diffusion.

Lorsqu'on cultive le microbe dans un milieu très nutritif, comme l'eau de levure sucrée, il présente la forme de bâtonnets allongés ressemblant beaucoup à ceux de la tourne à l'état jeune, mais plus dodus et beaucoup plus segmentés; s'il vieillit dans ce milieu, ou s'il est ensemencé dans des liquides moins nutritifs, comme le bouillon Liebig sucré, il se résout en très petits articles serrés les uns contre les autres et formant des amas tout à fait caractéristiques; le ferment de la tourne ne présente jamais ce dernier aspect.

Un assez grand nombre de substances sont fermentescibles; d'autres au contraire restent complètement inattaquées par le microbe mannitique. Voici comment se répartissent celles que nous avons essayées :

1. Sur les ferments des maladies du vin (*C. R.*, 25 avril 1898).

1° Substances qui fermentent.	2° Substances qui ne fermentent pas.	
Lévulose.	Mannite.	Amydaline.
Sorbose.	Dulcite.	Arbutine.
Glucose.	Sorbite.	Coniférine.
Sucre interverti.	Tréhalose.	Esculine.
— neutre.	Fécule.	Populine.
Galactose.	Inuline.	Tannin.
Mannose.	Glycogène.	Acide lactique.
Saccharose.	Gomme.	— succinique.
Maltose.	Dextrine.	— malique.
Lactose.	Arabinose.	— tartrique[1].
Raffinose.	Erythrite.	— citrique.
Xylose.	Glycérine.	
	Glycol.	
	Alcool.	

Dans le premier groupe, on ne trouve que des hydrates de carbone à molécule bien définie, à l'exclusion des acides organiques, des alcools, des polysaccharides amorphes et des glucosides.

On remarquera que les deux pentoses isomères, le xylose et l'arabinose, ne se comportent pas de même vis-à-vis du ferment mannitique et que le premier seul est décomposé.

Parmi les sucres hydrolysables, le tréhalose se distingue aussi, par sa résistance, du saccharose, du maltose, du lactose et du raffinose.

Enfin, parmi les hexoses, le lévulose occupe une place à part, car il donne seul de la mannite, de telle sorte que notre ferment n'est vraiment mannitique qu'en présence du lévulose.

5° *Culture simultanée du ferment mannitique et de la levure alcoolique.* — Ces deux organismes se rencontrent quelquefois dans la cuve de vendange, il est intéressant de savoir dans quelle mesure ils peuvent se gêner mutuellement. Nous savons déjà que la levure n'empêche pas la fermentation mannitique, mais nous allons voir que le ferment mannitique nuit au contraire sensiblement au développement de la levure.

Deux fioles de même contenance, renfermant le même liquide sucré et ensemencées simultanément avec du *S. pasto-*

1. Nous avons reconnu de nouveau que la crème de tartre reste inattaquée, même en milieu legèrement sucré, aérobie ou anaérobie. Le ferment mannitique, comme nous l'avons déjà dit, est donc différent du ferment de la tourne; et, loin de vivre dans le milieu précédent, il y meurt au contraire au bout d'un temps relativement court, deux mois environ.

rianus, ont fermenté et donné, l'une et l'autre, au même moment 7,4 0/0 d'alcool. On a ajouté alors du ferment mannitique à l'une des cultures, sans rien modifier à l'état de la seconde, et l'on a fait des essais comparatifs des deux liquides, 4 jours et 16 jours après. Les analyses ont donné, par litre :

	Après 4 jours		Après 16 jours	
	avec S. pastorianus seul.	avec S. pastorianus et fermant mannitique.	avec S. pastorianus seul.	avec S. pastorianus et ferment mannitique.
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.
Sucre restant	7,15	37,88	0,00	18,52
— disparu	55,35	24,62	62,50	43,78
Alcool	25,40	7,20	30,40	10,40
Acidité	0,17	2,90	0,65	4,60
Mannite	0,00	7,07	0,00	15,87

Le sucre a donc disparu moins vite en présence des deux ferments qu'avec la levure seule ; et, de plus, une partie de ce sucre a servi à faire de la mannite et non de l'alcool. Du poids de l'alcool formé, on peut déduire le poids de sucre ayant fermenté alcooliquement et l'on trouve :

	Après 4 jours.	Après 16 jours.
	Gr.	Gr.
Avec le S. pastorianus seul	48,20	62,50
—— et le ferment mannitique.	14,92	21,53

La présence du microbe mannitique a donc réduit des deux tiers environ l'activité du *S. pastorianus*.

Voici une expérience où l'on peut mesurer à la fois les actions inverses et réciproques de ces deux organismes. Trois fioles ont été ensemencées en même temps, l'une avec le ferment mannitique seul, l'autre avec une levure alcoolique seule, et la troisième avec le mélange de la levure et du ferment. Au bout d'un mois, l'analyse de ces trois liquides a donné :

	Sucre disparu.	Alcool formé.
1. Avec le ferment mannitique	32gr,44	traces
2. — la levure alcoolique	149,75	72gr,00
3. — le ferment et la levure	87,04	24,21

On déduit de là que 61 gr, 18 seulement de sucre, au lieu de 149 gr, 75, ont fermenté alcooliquement dans la fiole n° 3 et que, par suite, le ferment mannitique gêne le développement de la

levure ; qu'au contraire, la levure n'a pas gêné le ferment mannitique, puisque celui-ci a pu, malgré cette symbiose, attaquer 35gr.86 au lieu de 32gr.44, qu'il avait fait disparaître en vivant seul.

Il résulte de ces faits que, si le ferment mannitique apparaît dans une cuve de vendange, dans certaines conditions de chaleur, la levure alcoolique ne sera pas gênée seulement par l'élévation de le température et par l'alcool déjà produit, elle le sera encore, dans une large mesure, par ce ferment de maladie.

II

FERMENTATION DES HEXOSES

1° **Lévulose.** — Ce sucre fermente avec une admirable facilité, quelle que son origine, et toujours il donne de la mannite, des acides fixes, des acides volatils, de la glycérine et une certaine proportion d'acide carbonique.

Pour établir l'équation complète de la fermentation, il faut en doser tous les produits ; mais si l'on ne veut que suivre la marche d'une expérience, il suffit de doser un quelconque des éléments de la réaction, la mannite par exemple, ou mieux encore, parce que leur détermination est plus facile et plus rapide, le sucre disparu, l'acidité totale ou l'acidité volatile.

a). *Mannite.* — On sait qu'elle se décèle aisément par la formation de cristaux caractéristiques, obtenus en concentrant à une douce température, dans un verre de montre par exemple, quelques centimètres cubes de liquide de culture ; ses houppes soyeuses sont visibles en général en moins de 24 heures ; mais leur apparition peut être retardée pendant deux ou trois jours lorsque la solution renferme un excès de matières étrangères, sucre ou substances nutritives, avec une proportion relativement faible de mannite.

On facilite sa cristallisation en faisant fermenter préalablement les matières sucrées et en déféquant la liqueur par le sous-acétate de plomb, ou mieux encore avec de l'oxyde jaune de mercure.

Pour la doser, nous avons appliqué la méthode décrite dans notre premier mémoire ; de nouveaux essais synthétiques nous ont montré en effet qu'elle est exacte toutes les fois que la mannite peut cristalliser franchement par évaporation.

Voici les chiffres que nous avons obtenus dans différentes conditions de culture :

	Conditions de la culture.		Poids de lévulose fermenté, par litre.	Mannite formée par litre.	Mannite formée Proportion.
			Gr.	Gr.	
1.	Eau de levure.	à l'air	9,12	5,72	62,70/0
2.		dans le vide		5,65	61,9
3.	id.	à l'air	19,38	11,45	59,1
4.		dans le vide		11,28	58,2
5.	id. plus concentrée	en grande surface	20,45	12,95	63,3
6.		en profondeur...		13,08	64,0
7.		dans le vide.....		12,86	61,5
8.	Eau de levure dans le vide.....		14,52	10,43	71,8
9.	—	—	51,26	33,39	65,1
10.	Bouillon Liebig	en grande surface	19,08	11,68	61,2
11.		en profondeur...		11,92	62,5
12.		dans le vide		11,80	61,8
13.	—	à l'air, sans craie.	37,35	26,62	71,3
14.	—	— avec craie.	39,36	26,48	67,3
15.	—	— —	137,85	99,45	72,1
16.	—	— —	218,00	158,64	72,8

Le poids de sucre qui se décompose en milieu acide ne dépasse guère 70 grammes par litre ; mais, en présence de la craie, on peut atteindre près de 250 grammes, et obtenir jusqu'à 175 grammes de mannite par litre.

On voit que la proportion de mannite formée n'est pas constante, et qu'elle dépend, dans une assez large mesure, de la nature du liquide nutritif, de sa richesse en principes utiles, des conditions initiales d'aération ou de vide, de la neutralité ou de l'acidité de la culture, etc.

Elle dépend en particulier des quantités de sucre mis à fermenter et devient relativement faible dans les solutions faibles de lévulose, alors qu'inversement dans les mêmes conditions, comme on va le voir, l'acidité augmente : la mannite cristallise alors difficilement et ne peut guère être décelée dans les cultures ayant renfermé moins de 2 grammes de lévulose par litre ; au-dessus, on obtient des cristaux caractéristiques, même sans défécation préalable.

Dans les liquides complètement fermentés et abandonnés à eux-mêmes, nous n'avons jamais constaté de diminution dans la mannite, malgré un contact prolongé avec le dépôt du fer-

ment. Celui-ci ne vit pas d'ailleurs dans les solutions nutritives de mannite.

Les autres produits de la fermentation offrent des variations analogues à celles de la mannite.

b). *Acide acétique*. — L'acide volatil dû à l'action du ferment mannitique sur la lévulose est de l'acide acétique pur ; nous en avons donné la preuve en appliquant la méthode Duclaux [1] à une culture en bouillon Liebig ; il n'est pas inutile de montrer qu'il en est de même avec l'eau de levure [2]. Voici en effet quelles ont été dans la distillation fractionnée de 110 c.c. d'un liquide acide, extrait d'une fermentation achevée, les valeurs de B, comparées à celles qui caractérisent l'acide acétique pur.

	Valeurs de B.		
	Culture.	Acide acétique [2].	Différences.
	—	—	—
1	6,0	5,9	+ 0,1
2	12,3	12,2	+ 0,1
3	18,9	18,7	+ 0,2
4	25,8	25,6	+ 0,2
5	32,9	32,7	+ 0,2
6	40,6	40,4	+ 0,2
7	48,7	48,7	0,0
8	57,5	57,5	0,0
9	67,4	67,5	— 0,1
10	80,0	80,0	0,0

Les quantités d'acide acétique produit, par rapport au poids de sucre disparu, ont varié dans les limites suivantes, pour des cultures renfermant 20 grammes et plus de lévulose par litre :

Avec l'eau de levure à l'air, de	13,3 0/0	à	16,2 0/0
— — dans le vide..	13,0	—	15,9
Avec le bouillon Liebig à l'air sans craie.	13,4	—	15,7
— — avec craie.	12,8	—	15,6
— dans le vide sans craie.	13,9	—	14,5

La proportion ne reste pas constante pendant la durée d'une même fermentation, mais elle varie relativement peu. Ainsi en 8 mois elle est passée de 13,8 à 12,8 0/0 de sucre disparu dans du bouillon Liebig additionné de craie, où 240 grammes de lévulose par litre avaient fermenté ; et, en 18 jours, elle est passée

1. Voir plus loin la note relative au glucose.
2. Duclaux, *Microbiologie*, tome III, page 386.

de 14,4 à 13,4 0/0 dans de l'eau de levure sans craie, pour 70 grammes de sucre total disparu.

Les différences sont beaucoup plus grandes, si l'on compare des cultures renfermant peu de lévulose avec des cultures de richesse moyenne ; dans les premières, l'acide acétique est beaucoup plus abondant que dans les secondes. Des solutions croissantes de lévulose dans une même eau de levure ont donné :

Lévulose par litre.	Proportion d'acide acétique formé.
—	—
1 gramme.	34 0/0
2 grammes.	27,5
4 —	21,8
8 —	18,1
12 —	16,8
16 —	14,5

La richesse en acide acétique décroît donc quand le poids de lévulose mis à fermenter augmente; elle tend à rentrer dans les limites normales pour des solutions contenant environ 15 grammes ou plus de sucre par litre.

c). *Acide lactique.* — Sauf une petite quantité d'acide succinique, dont il sera question plus loin, les acides fixes produits pendant la fermentation mannitique du lévulose sont constitués par de l'acide lactique. Les proportions de ce corps sont soumises à des variations de même grandeur que celles de l'acide acétique; nous avons trouvé en effet :

Avec eau de levure à l'air.....	de 9,8 0/0	à	15 0/0
— — dans le vide.....	11,0	—	15,0
Avec bouillon Liebig à l'air.....	9,8	—	13,9

Le poids d'acide lactique formé est en général inférieur à celui de l'acide acétique; il ne le dépasse que rarement.

Dans les diverses phases d'une même culture, la proportion change peu; elle était, dans une expérience, de 15,3 0/0 du sucre disparu au bout de 5 jours, et se trouvait encore de 14,9 0/0 au bout de 18 jours, bien que le poids de lévulose fermenté eût plus que doublé d'une analyse à l'autre.

Comme l'acide volatil, l'acide lactique se produit plus abondamment dans les solutions faibles que dans les solutions riches en lévulose : à 2 gr. de sucre par litre, la proportion dosée était

de 27.5 0/0 ; à 4 gr. dans le même milieu, elle est descendue à 14,8 0/0, et à 8 gr. elle n'était plus que de 10,1 0/0.

Pour rechercher la nature de l'acide lactique produit par la fermentation mannitique du lévulose, on a fait du lactate de zinc, qu'on a purifié par cristallisations et lavage à l'eau alcoolisée.

Une partie des échantillons a été redissoute et soumise à des cristallisations fractionnées. Tous les sels ainsi obtenus ont ensuite été étudiés comparativement au point de vue de leur solubilité à la température ordinaire, de leur eau de cristallisation et de leur pouvoir rotatoire.

La solubilité a été déterminée en évaporant les solutions à la température de 30°: l'eau de cristallisation a été obtenue en chauffant le sel à 160°, et la rotation a été mesurée en degrés saccharimétriques avec des solutions saturées. Le tableau suivant donne les résultats de ces opérations :

	Solubilité.	Eau de cristallisation.	Rotation.
Lactate d'une 1re fermentation.			
1ers cristaux.....	2,20 0/0	17,9 0/0	+ 0,1
2es —	2,76	17,7	+ 0,1
3es —	2,15	17,5	+ 0,4
Ensemble.....	3,40	16,1	+ 0,3
Lactate d'une 2e fermentation.			
1ers cristaux.....	2,32	18,3	+ 0,4
2es —	2,24	18,2	+ 0,1

Le lactate inactif cristallisant avec 18.1 et le lactate actif avec 12, 9 0/0 d'eau, le premier ayant une solubilité voisine de 2 et le second supérieure à 5, on voit que le lactate de zinc obtenu dans nos expériences est du lactate inactif mélangé avec une très petite proportion de lactate droit. Et comme le pouvoir rotatoire de l'acide lactique est de sens contraire à celui de son sel de zinc, il en résulte que l'acide lactique dû au ferment mannitique est un mélange d'acide inactif et d'une petite quantité d'acide gauche.

d). Acide carbonique. — Après plusieurs essais plus ou moins heureux, nous nous sommes arrêtés au dispositif suivant pour doser l'acide carbonique produit pendant la fermentation :

Un ballon Pasteur à deux cols ayant été rempli du liquide de culture, on étire avec soin et l'on ferme à la lampe la tubu-

lure principale; on étrangle la tubulure latérale et on coiffe son extrémité par un tube de caoutchouc muni d'un tube à bourre de coton. Le ballon est alors stérilisé en entier à l'autoclave; après refroidissement, on fait l'ensemencement avec les précautions d'usage, et, inclinant la tubulure latérale, on la relie à une trompe à mercure. On fait le vide complet et l'on ferme l'étranglement au chalumeau.

Quand la culture est terminée, on fixe sur la tubulure principale le tube en caoutchouc de la trompe à mercure, de façon que l'extrémité étirée y remonte de quelques centimètres; on fait le vide et l'on s'assure que l'air extérieur ne pénètre par aucune fuite; alors, inclinant la pointe de la tubulure sur les parois du caoutchouc, on la brise par simple pression, et le gaz produit pendant la fermentation commence à se dégager. On règle son écoulement, s'il est nécessaire, à l'aide d'une vis de pression qui aplatit plus ou moins le tube de caoutchouc.

Avant de se rendre dans les éprouvettes graduées où on le recueille, la gaz se dessèche sur de la ponce sulfurique; on arrête la trompe après un commencement d'ébullition du liquide, quand le volume du gaz n'augmente plus d'une façon sensible.

Le gaz était complètement aborbable par la potasse et exempt d'hydrogène.

Le poids d'acide carbonique a été calculé en tenant compte de la température et de la pression; comme il était desséché pendant son dégagement et que le mercure employé était lui-même desséché sur de l'acide sulfurique, il n'y avait pas lieu de faire de correction tenant à la présence de la vapeur d'eau.

Les résultats obtenus dans divers essais se trouvent consignés dans le tableau suivant :

Liquide de culture.	Lévulose total disparu.	Acide carbonique produit. Poids.	Acide carbonique produit. Proportion.
—	—	—	—
	Gr.	Gr.	
Eau de levure.....	14,52	0,971	6,7 0/0
—	6,135	0,632	10,3
—	7,783	0,947	12,17
—	82,625	6,063	7,34
Bouillon Liebig.....	5,724	0,514	8,98

On retrouve pour l'acide carbonique, comme pour l'acide

acétique, l'acide lactique et la mannite, des variations dépendant des conditions dans lesquelles ont été faites les cultures.

Il résulte de là que, pour avoir le tableau complet des transformations d'un poids donné de lévulose, on ne peut établir des moyennes, et qu'il faut, dans chaque cas, doser tous les produits engendrés. Faisons ainsi pour quelques expériences, et nous aurons des exemples d'équations de la fermentation mannitique.

	I	II	III	IV
Acide acétique...	13,4 0/0	14,9 0/0	14,6 0/0	13,0 0/0
— lactique....	9,9	11,5	13,9	15,0
— mannite...	71,8	62,9	60,0	65,1
— carbonique.	6,7	10,3	11,3	7,3

Tels sont les poids, variables, d'acides fixes, d'acides volatils et de mannite produits par 100 grammes de lévulose. Pour chercher s'ils représentent tout le sucre fermenté, on ne peut en faire l'addition, parce que la mannite est plus hydrogénée et l'acide carbonique plus oxygéné que le lévulose.

Il vaut mieux faire le bilan du carbone seul. On trouve ainsi par le calcul, pour 100 grammes de carbone initial :

	I	II	III	IV
Carbone contenu dans l'acide acétique....	13,4	14,9	14,6	13,0
— — — lactique.....	10,0	11,5	13,9	15,0
— — la mannite.....	71,0	62,2	59,3	64,4
— — l'acide carbonique..	4,6	7,0	7,7	5,0
Carbone total.....	99,0	95,6	95,5	97,4

Il résulte de ces chiffres que les produits étudiés renferment la plus grande partie du carbone du lévulose mis à fermenter ; une faible partie a été utilisée par le ferment pour sa constitution, et nous allons voir qu'une autre partie a servi à la production d'acide succinique et de glycérine.

e). *Acide succinique.* — La recherche de ce corps et celle de la glycérine ont un intérêt particulier, en raison de leur formation constante dans la fermentation alcoolique, mais la présence de quantités relativement grandes d'acide lactique et d'acide acétique rend cette recherche assez délicate. Voici la marche que nous avons suivie pour l'acide succinique :

On concentre au bain-marie 300 centimètres cubes de liquide fermenté ; l'acide acétique se volatilise ; on ajoute ensuite du

sable calciné au produit sirupeux ainsi obtenu, et l'on traite successivement, à froid, ou à chaud dans un appareil à déplacement, par l'éther seul, ou par un mélange d'éther rectifié et d'alcool absolu à parties égales. On réunit les liqueurs et on évapore les dissolvants; il reste un liquide sirupeux qu'on abandonne pendant quelques jours dans une atmosphère sèche et qui ne tarde pas à se remplir de cristaux blancs, pailletés et légers. On lave ces cristaux avec une soluttion saturée et glacée d'acide succinique pur, qui enlève l'acide lactique et la glycérine s'il y en a; comme ces cristaux sont légers et difficiles à mouiller, ils flottent en partie sur la solution succinique ; aussi, pour les séparer, ne peut-on pas se contenter de décanter celle-ci, comme on le fait pour le dosage de la crème de tartre par le procédé Pasteur; il faut les recueillir sur un filtre.

Après le lavage, le filtre est d'abord bien égoutté, puis séché dans le vide sulfurique; les cristaux se détachent alors facilement et on peut les peser. Si l'on desséchait le filtre dans une étuve, on s'exposerait à voir les cristaux disparaître par redissolution dans l'eau qui imprègne encore le papier du filtre.

On sépare encore les cristaux avec facilité en jetant tout le magma sur une plaque poreuse; quand toute la partie liquide a été absorbée, on lave avec une petite quantité de solution saturée froide d'acide succinique.

En appliquant la méthode, nous avons toujours obtenu de ces cristaux dont l'aspect et la forme cristalline sont identiques à ceux de l'acide succinique pur et sec. Chauffés dans des tubes fins, dans de l'huile de vaseline, en même temps que ce dernier, ils ont fondu à la température de 180°; ils se sont volatilisés et sublimés à une température plus haute, exactement comme l'acide témoin. Enfin, ils ont le même pouvoir de saturation pour les bases, pour l'eau de chaux par exemple, comme le montrent les chiffres suivants.

	Poids d'acide dissous.	Volume d'eau de chaux.	Acide succinique calculé.
Acide succinique pur.	0gr,046	17cc,7	0gr,0453
Acide de fermentation.	0,014	5,2	0,0133

C'est donc bien de l'acide succinique.

Dans un dosage portant sur 300 c. c. d'un liquide ayant fermenté avec 20 grammes de lévulose par litre, on a trouvé

0gr,037 de cet acide, soit 0gr,123 par litre ou, pour 100 grammes de sucre, 0gr,615. Il est intéressant de rapprocher ce chiffre de celui 0gr,65, que Pasteur a trouvé pour l'acide succinique produit par la fermentation alcoolique de 100 grammes de saccharose.

f). *Glycérine.* — Cette substance a été recherchée par la méthode Pasteur, et l'on a obtenu un liquide ayant tous les caractères de la glycérine : onctueux, de saveur douceâtre, se vaporisant en fumées blanches d'odeur un peu âcre, et produisant de l'acroléine à chaud après mélange avec du bisulfate de potasse.

On ne peut songer à la doser par cette méthode, car des essais synthétiques ont montré qu'on ne la retrouve pas, et à beaucoup près, tout entière.

La méthode de M. Laborde[1] donne des résultats plus satisfaisants : dans des essais synthétiques, on a retrouvé, à 5 0/0 près, la glycérine ajoutée ; appliquée au liquide fermenté lui-même, sans traitement préalable au sous-acétate de plomb et sans concentration, elle a donné, pour cent de lévulose[2] :

Culture sans craie.....	1,50 0/0 de glycérine.
Culture avec craie.....	0,93 —

La craie diminue donc la proportion de glycérine formée ; et, comme en sa présence, le microbe à une vie plus facile, que la fermentation est plus active, on retrouve là un fait de même nature que celui observé par M. Laborde dans la fermentation alcoolique par les levures ordinaires[3] ;

g). *Poids du ferment.* Quand une culture est achevée, on la retire de l'étuve et on l'abandonne pendant quelques jours à la température ordinaire. Peu à peu, tout le ferment se tasse au fond du matras, et le liquide surnageant devient limpide. On décante celui-ci avec précaution, et, quand il commence à se troubler, on le verse sur un filtre taré. Le dépôt est lavé ensuite avec de l'eau pure et, après dessication, on a le poids du ferment. En opérant ainsi avec 710 c. c. de liquide ayant contenu

1. *Mém. de la Soc. des Sc. phys. et nat. de Bordeaux*, 1895.
2. Des essais directs ont montré que l'eau de levure employée ne renfermait ni acide succinique ni glycérine.
3. *C. R. de l'Académie des Sciences*, août 1899.

$16^{gr},29$ par litre, soit au total $11^{gr},566$ de lévulose, on a obtenu $0^{gr},272$ de ferment sec, soit 2,35 0/0 du lévulose fermenté.

Si, maintenant, on calcule le carbone contenu dans l'acide succinique, dans la glycérine et dans le ferment, en supposant que celui-ci, assimilé à de la matière albuminoïde, en renferme 54,3 0/0, et qu'on l'ajoute à la moyenne du carbone contenu à la fois dans l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide carbonique et la mannite, on aura, avec une approximation qui ne dépasse pas la limite des erreurs d'expériences, la répartition du carbone, et par conséquent du lévulose entre les produits essentiels de sa fermentation, savoir :

	Carbone
Acides acétique, lactique et carbonique, mannite	96,88
Acide succinique	0,25
Glycérine	0,59
Ferment mannitique	1,28
Total	99,00

Le lévulose se retrouve ainsi complètement, et l'on peut dire qu'en dehors des substances étudiées, sa fermentation n'en produit pas d'autres, ou du moins qu'elle n'en produit qu'en quantités infinitésimales :

h). *Équation de la fermentation.* — La formation de l'acide lactique et de l'acide acétique, aux dépens du lévulose, s'explique facilement par un simple dédoublement. On a en effet :

Pour l'acide lactique ..... $C^6H^{12}O^6 = 2C^3H^6O^3$
— acétique ..... $C^6H^{12}O^6 = 3C^2H^4O^2$

Pour la mannite, qui renferme un excès d'hydrogène, il faut faire intervenir l'eau dont l'oxygène servira à former de l'acide carbonique. L'équation suivante rend compte de la réaction.

$$13C^6H^{12}O^6 + 6H^2O = 12\,C^6H^{14}O^6 + 6\,CO^2$$

Il résulte de cette équation que le rapport de la mannite à l'acide carbonique est de $\frac{2184}{264} = 8,3$.

C'est donc dans le même rapport que ces deux corps devraient se trouver dans les produits de la fermentation mannitique, s'il n'y avait aucune perturbation. En fait, dans l'expérience IV, on a

eu $\frac{65,1}{7,3} = 8,9$. chiffre qui confirme le précédent et par conséquent l'équation proposée.

Il semble, d'après cela, que les trois réactions puissent être indépendantes, et que le ferment soit capable de faire, suivant les cas, ou de l'acide acétique seul, ou de l'acide lactique seul, ou de la mannite, sans augmentation de l'acidité de la liqueur. La chose ne s'est cependant jamais produite dans nos expériences et tous ces corps se sont toujours formés à la fois.

L'acide succinique et la glycérine sont peut-être à la fois des résidus de la vie du microbe et des traits d'union entre les autres produits de la fermentation.

2° **Glucose.** — Le glucose fermente avec moins de facilité que le lévulose, et encore faut-il que le milieu soit très riche en aliment. Des cultures comparatives, faites dans des eaux de levure préparées avec une même levure pressée, mais de concentrations différentes, contenant chacune le même poids de sucre par litre, ont donné, au bout d'un mois, toutes choses égales d'ailleurs :

Richesse de l'eau de levure.	Glucose disparu par litre — En poids.	Glucose disparu par litre — Proportion.
—	—	—
	Gr.	
20 0/0	10,34	53 0/0
12	4,58	23,5
5	3,10	15,9

Si donc on veut obtenir des fermentations abondantes, il faut employer des eaux de levure très concentrées. Il en est de même avec le bouillon Liebig, dont la dilution à 3 0/0 est beaucoup plus favorable qu'une dilution plus faible à 2 ou à 1 0/0.

La quantité de glucose fermenté ne dépend pas seulement de la richesse du milieu en principes nutritifs ; elle dépend aussi de son acidité, car elle ne dépasse guère 20 à 25 grammes par litre si les acides produits par la réaction restent libres, tandis qu'elle dépasse 60 grammes, si on les neutralise par la craie.

Les moindres influences peuvent modifier la rapidité de la fermentation; ainsi. dans une fiole complètement pleine de liquide de culture, il a disparu, dans le même temps, plus de glucose que dans une fiole de grande capacité, mais très incomplètement remplie : $15^{gr},19$ seulement par litre dans la seconde

au lieu de 21 grammes dans la première, et 19gr,26 dans une fiole à demi pleine.

Quelles que soient les conditions de la culture, on n'obtient jamais de mannite. Ce corps est remplacé par de l'alcool éthylique, qui se trouve mélangé, comme la mannite dans la fermentation du lévulose, avec de l'acide acétique, de l'acide lactique, de l'acide succinique et de la glycérine ; il se fait aussi de l'acide carbonique qui se diffuse sans donner de bulles dans le bouillon Liebig et qui, au contraire, produit une mousse plus ou moins abondante dans l'eau de levure concentrée.

a). *Acide acétique.* — L'acide volatil engendré pendant la fermentation est de l'acide acétique pur[1], comme avec le lévulose.

Les proportions d'acide acétique ont varié dans d'assez grandes limites ; on a trouvé :

Dans eau de levure, de 5,5 à 11,9 0/0 du sucre fermenté.
— bouillon Liebig, de 5,2 à 12,6 — —

Les écarts sont plus grands qu'avec le lévulose ; mais, dans les mêmes conditions, le glucose donne toujours moins d'acidité volatile.

L'influence de la richesse nutritive du milieu, de sa nature, de l'âge de la culture sont ici particulièrement sensibles. Ainsi, dans l'expérience citée plus haut, faite avec des eaux de levure de concentrations variables, on a obtenu les proportions suivantes d'acide acétique pur par rapport au poids de sucre fermenté :

Avec eau de levure à 20 0/0	6,3 0/0
— — 12	8,0
— — 5	11,9

1. En dosant les acides volatils en eau de levure, il faut naturellement tenir compte de ceux qu'on sait exister dans l'eau de levure lorsqu'elle n'a pas été récemment lavée et égouttée, ou lorsqu'elle n'est pas fraîche. Ces acides, qui ne sont pas à l'état libre, mais qui distillent en présence de l'acide sulfurique, sont de l'acide acétique mélangé d'un peu d'acide propionique ou d'acide butyrique.

Comme, après fermentation, la culture renferme des acides fixes et des acides volatils, le dosage de ces derniers est faussé en quantité et en qualité par le déplacement et la mise en liberté des acides volatils de l'eau de levure. La cause d'erreur est d'autant plus importante qu'il y a moins d'acide acétique produit par la fermentation ou moins de sucre décomposé. Elle reste au contraire sans effet sensible, et risque de passer inaperçue, dans les fermentations abondantes, comme celles qu'on peut obtenir avec le lévulose. Avec la levure de brasserie fraîche, bien lavée et égouttée, nous n'avons pas eu les mêmes inconvénients.

L'acide acétique augmente donc quand l'eau de levure s'appauvrit, il diminue au contraire avec la dilution du bouillon Liebig; en effet, on a trouvé avec celle-ci :

Dans l'extrait Liebig à 3 0/0	11,5 0/0
— — 2	9,7
— — 1	7,0

Pendant la durée d'une même culture, l'acidité volatile augmente non seulement en valeur absolue, mais même relativement au poids total du sucre disparu, comme le montre le tableau suivant :

Durée de la fermentation.	Sucre disparu.	Acide acétique formé. Poids.	Acide acétique formé. Proportion.
	Gr.	Gr.	
2 jours	15,30	0,346	2,26 0/0
3 —	20,04	1,304	6,51
5 —	26,69	1,969	7,38
13 —	30,45	2,901	9,53

Ces variations étant, en général, corrélatives de variations correspondantes dans la quantité d'acide lactique formé, nous y reviendrons un peu plus loin.

Contrairement à ce qui arrive pour le lévulose, la richesse en acide acétique n'augmente pas pour les très faibles doses de glucose fermenté. Pour des solutions renfermant respectivement de 1 à 5 grammes de sucre, la proportion d'acide volatil n'a varié, en effet, que de 10,8 à 12 0/0.

b). *Acide lactique.* — Il se forme beaucoup plus abondamment qu'avec le lévulose, mais toujours en proportions variables avec les conditions de culture; ainsi, il a oscillé entre 25 et 34 0/0 dans des fermentations complètement achevées en eau de levure, et de 30 à 44, 5 0/0 en bouillon Liebig.

Il est de même nature que l'acide dérivé du lévulose, et il donne les mêmes sels de zinc, ayant les propriétés suivantes :

Rotation	+ 0,4
Solubilité	2,52
Perte à 160°	18,06

Il est donc constitué par de l'acide inactif mélangé avec une très petite quantité d'acide gauche.

Si l'on suit sa production aux diverses phases d'une même

fermentation; on constate qu'il augmente en valeur absolue, mais que sa proportion, par rapport au sucre disparu, diminue. Ainsi, dans l'expérience ci-dessus, qui donne les variations de l'acide volatil, on a obtenu :

Durée de la fermentation.	Sucre disparu.	Acide lactique formé. Poids.	Acide lactique formé. Proportion.
—	—	—	—
	Gr.	Gr.	
2 jours.....	15,30	5,471	35,76 0/0
3 —	20,06	6,909	34,48
5 —	26,69	9,304	34,86
13 —	30,45	9,264	30,42

Voici encore une expérience où l'on retrouve les mêmes faits, et où l'on voit en même temps la marche ascendante de l'acidité totale exprimée en acide sulfurique.

Durée de la fermentation.	Sucre disparu.	Acidité totale en acide sulfurique.	Acide acétique formé. Poids.	Acide acétique formé. Proportion.	Acide lactique formé. Poids.	Acide lactique formé. Proportion.
—	—	—	—	—	—	—
	Gr.	Gr.	Gr		Gr.	
3 jours.....	10,02	2,79	0,73	7,28 0/0	4,02	40,12 0/0
9 —	16,52	4,64	1,62	9,81	6,10	36,92
12 —	18,32	4,85	2,34	12,77	5,40	29,48
18 —	19,98	5,53	3,41	17,07	5,03	25,18
44 —	21,60	5,60	3,73	17,27	4,68	21,67

Il semble donc que l'acide lactique, sous l'action prolongée du ferment, se transforme en partie en acide acétique, ce qui s'explique d'ailleurs parfaitement par la relation connue.

$$2\,C^3H^6O^3 = 3\,C^2H^4O^2$$

Cette transformation ne s'arrête pas au moment où la totalité du glucose a fermenté; elle se poursuit encore longtemps après, comme le montre l'expérience suivante :

En 13 jours, une fermentation de 21 grammes par litre de glucose en eau de levure ayant été achevée, on a fait l'analyse du liquide, puis on l'a abandonné à l'étuve et, au bout de 1 et de 2 mois, on a refait le dosage des acidités. Voici les résultats :

	Acide acétique.	Acide lactique.	Rapport $\frac{\text{ac. acétique.}}{\text{ac. lactique}}$
	—	—	—
	Gr.	Gr.	
Fermentation achevée..	1,41	7,13	5,0
Un mois après.....	1,98	6,17	3,1
Deux mois après.....	2,75	4,96	1,8

On voit que le rapport des deux acides a diminué de plus de moitié pendant la durée de l'expérience, bien qu'il n'y eût plus de sucre susceptible de fermenter.

Des essais directs ont montré que l'alcool n'était pas l'origine de l'accroissement d'acidité volatile.

c). *Alcool.* — Quand on distille dans une cornue le produit de la fermentation du glucose, il y a production de gouttelettes huileuses, et les premières parties condensées ont une saveur et une odeur franchement alcooliques.

En distillant dans un appareil à colonne une quantité suffisante de liquide, traitant ensuite le produit recueilli par du carbonate de potasse sec et redistillant sur de la chaux vive, on obtient, par rectification, d'abord quelques gouttes passant avant 78° et possédant une forte odeur d'aldéhyde, puis, en presque totalité, un liquide passant à 78°, et enfin quelques centimètres cubes passant de 78 à 100°, ayant une odeur désagréable qui rappelle à la fois le liquide de culture et les mauvais goûts de queue de l'alcool d'industrie.

Le liquide recueilli à 78° a tous les caractères de l'alcool pur, il en a la densité et le point d'ébullition; il brûle avec une flamme peu éclairante, se transforme aisément en iodoforme et en aldéhyde, donne de l'éther et de l'éthylène, suivant la température, avec l'acide sulfurique; c'est donc bien de l'*alcool éthylique.*

Le dosage en a été effectué par les méthodes usuelles : lorsqu'on ne disposait que de très petites quantités de liquide distillé, on se servait du compte-gouttes Duclaux : si le volume était suffisant, on employait la balance de Dalican ou un alcoomètre contrôlé donnant le 1/10e de degré.

La proportion d'alcool varie, quoique dans des limites plus restreintes, comme les autres produits de la fermentation, avec les conditions de vie du ferment; c'est ainsi qu'on a obtenu :

Avec eau de levure à l'air.....	de	19,4 à 27 0/0
— — dans le vide.....		19,2 à 29,2
Avec bouillon Liebig à l'air.....		18,7 à 20,9

d). *Acide carbonique.* — Le gaz de la fermentation, recueilli dans le vide et dosé comme il a été dit à propos du lévulose, a toujours été de l'acide carbonique pur; sa proportion a varié,

dans nos essais, de 17,2 à 22,8 0/0 du poids de glucose fermenté.

Pour connaître dans quel rapport se forment l'alcool et l'acide carbonique, il est nécessaire, en raisons des variations qu'ils présentent d'un essai à l'autre, de les doser dans une même expérience. En procédant ainsi, après fermentation complète de 34gr,886 de glucose dans eau de levure, on a trouvé :

	Gr.
Alcool	7,926
Acide carbonique	7,326

D'où l'on déduit : $\frac{\text{Alcool}}{CO^2} = 1,08.$

Ce rapport de l'alcool à l'acide carbonique est remarquable, car il est presque identique au rapport 51 1/49,2 = 1,04, que Pasteur a trouvé pour ces deux corps dans la fermentation alcoolique par la levure de bière. Son intérêt s'augmente encore de la production d'acide succinique et de glycérine, comme dans une fermentation alcoolique ordinaire.

e). *Acide succinique et glycérine.* — Ces deux corps ont été isolés et caractérisés comme il a été dit pour le lévulose; on a trouvé, pour 100 grammes de glucose fermenté :

	Gr.
Acide succinique	0,66
Glycérine	9,68

Le poids de glycérine est plus faible dans les fermentations très actives, en présence de la craie, par exemple.

f). *Poids du ferment.* — En opérant avec 551 c. c. d'eau de levure ayant contenu 18gr,15 par litre, soit 10 grammes de glucose, on a obtenu 0gr,232 de ferment sec, soit 2,32 0/0 du sucre fermenté.

Si maintenant on dresse, pour une expérience donnée, le tableau des produits engendrés par la fermentation complète de 100 grammes de glucose contenant 40 grammes de carbone, on aura :

Acide acétique	8,56
— lactique	31,36
Alcool	22,72
Acide carbonique	21,00
— succinique	0,66
Glycérine	9,68
Poids du ferment	2,32
Total	96,30

Ce qui représente, en valeur absolue et relative, pour le carbone correspondant :

	Total.	Proportion.
Acide acétique — lactique	15,97	39,92
Alcool	11,85	29,62
Acide carbonique	5,73	14,33
— succinique	0,29	0,73
Glycérine	3,78	9,45
Ferment	1,26	3,15
	38,88	97,20

On ne retrouve pas exactement tout le carbone initial, mais la différence est faible et n'atteint pas 3 0/0.

L'écart peut s'expliquer soit par des erreurs d'analyse, soit par la présence d'une petite quantité d'un principe non isolé, qui n'est ni acide, ni volatil, ni cristallisable, et qui serait noyé dans les matières extractives apportées par le liquide de culture.

Quoi qu'il en soit, on voit que 50 0/0 au moins du glucose fermente alcooliquement comme avec un *saccharomyces*, et que le reste se transforme par dédoublement en un mélange d'acide acétique et d'acide lactique, conformément aux équations connues.

3° **Sucre interverti.** — On sait que, pris isolément, et toutes choses égales d'ailleurs, le lévulose fermente plus vite et plus abondamment que le glucose; il était intéressant de voir si ces deux sucres, mélangés en parties égales, comme ils le sont dans le sucre interverti et dans le moût de raisin, se comporteraient encore de la même façon l'un vis-à-vis de l'autre. L'expérience a montré qu'il en est bien ainsi, et que, si même la richesse saccharine initiale est élevée, le lévulose seul peut disparaître et le glucose rester intact.

Quand la richesse saccharine initiale est assez faible pour que tout fermente, on peut, en suivant la marche de la réaction, constater que le pouvoir rotatoire de la solution change de sens, atteint un maximum à droite et devient nul, exactement comme avec les levures alcooliques qui consomment plus facilement le lévulose que le glucose[1].

Tel est le cas suivant, relatif à du sucre interverti dissous daus l'eau de levure :

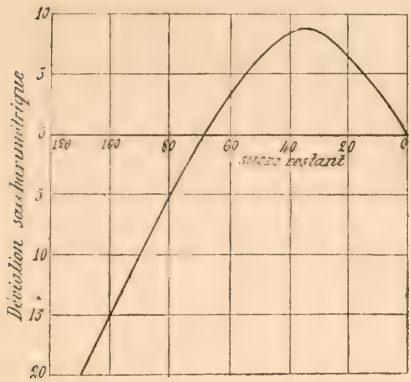
Durée de la fermentation.	Sucre total.	Rotation en degrés saccharimètres.
	Gr.	
»	19,68	— 3,4
2 jours	13,00	+ 1,2
3 —	6,99	+ 4,2
4 —	4,65	+ 4,8
5 —	2,70	+ 3,8
6 —	1,72	+ 2,2

En ajoutant de la craie à la culture, on fait fermenter une plus grande quantité de sucre interverti, mais la marche du phénomène reste la même, comme ci-après :

Durée de la fermentation.	Sucre total.	Rotation en degrés saccharimètres.
	Gr.	
»	108,70	— 18,4
2 jours	92,60	— 12,6
3 —	80,70	— 5,8
4 —	62,50	+ 0,6
5 —	52,00	+ 5,8
7 —	37,87	+ 9,6
9 —	28,73	+ 8,4
14 —	9,34	+ 4,0
17 —	7,94	+ 1,8

Si l'on traduit graphiquement ces derniers résultats, on obtient la courbe suivante où les abscisses représentent les quantités de sucre restant et les ordonnées les rotations correspondantes.

1. U. Gayon et E. Dubourg, Sur la fermentation alcoolique du sucre interverti (*C. R.*, avril 1890). — E. Dubourg, Contribution à l'étude des levures de vin, *Revue de Viticulture*, 1897.



Le ferment mannitique jouit donc d'un pouvoir électif, et, comme les levures spéciales étudiées par M. Dubourg, comme le *Tyrothrix tenuis* ou le *Bacillus mesentericus vulgatus*[1], il l'exerce en faveur du lévulose.

Le rapport G/L du glucose au lévulose, qui, dans le sucre interverti, est sensiblement égal à l'unité, va par suite en augmentant à mesure que la fermentation se poursuit, et, pour une même quantité totale de sucre disparu, ce rapport devra être plus ou moins élevé suivant que la fermentation sera lente ou rapide. C'est en effet ce que montre l'expérience suivante, faite dans de l'eau de levure, avec ou sans craie, avec ou sans addition d'alcool, où, pour faciliter les comparaisons, on a, par interpolation entre les nombres obtenus, calculé les valeurs de G/L pour des quantités régulièrement croissantes de sucre total fermenté :

Sucre total fermenté.	Valeur de $\frac{G}{L}$ dans eau de levure. Seule.	Additionnée de craie.	Additionnée d'alcool.
0 gramme	1,00	1,00	1,00
10 grammes	1,12	1,10	1,19
20 —	1,26	1,24	1,62
30 —	1,49	1,46	2,24
40 —	2,26	1,68	8,47
50 —	2,73	2,10	»
60 —	8,28	3,12	»

L'addition de craie, en facilitant la fermentation, a abaissé la valeur de G/L., tandis que l'addition d'alcool, qui l'a ralentie,

1. A. Péré, *Ann. Institut Pasteur*, t. X, page 436, 1896.

a rapidement élevé le rapport du glucose au lévulose. Le ferment mannitique, vivant dans le sucre interverti, attaque donc d'autant moins le glucose qu'il est plus gêné dans son développement.

Au point de vue des produits de la réaction, chacun des sucres constituant le sucre interverti se comporte comme s'il était seul, et l'on obtient un mélange de mannite et d'alcool, avec de l'acide carbonique, de l'acide acétique, de l'acide succinique et de la glycérine.

Les proportions sont généralement comprises entre celles qui appartiennent au glucose et au lévulose, mais avec des variations dues, comme toujours, aux conditions physiques et chimiques de la culture. Voici par exemple les nombres obtenus après fermentation complète de 21 gr. 55 de sucre dans eau de levure :

Acide acétique	9,82 0/0
— lactique	27,00
Alcool	14,69
Mannite	32,25

La proportion d'acide carbonique, déduite d'une autre expérience, s'est élevée à 13,50 0/0.

L'acide volatil est de l'acide acétique pur ; nous l'avons également vérifié avec du moût de raisin.

Les vins mannités, comme nous l'avons dit ailleurs, ne renferment donc que de l'acide acétique pur, à l'exclusion de l'acide propionique et de l'acide butyrique. C'est une nouvelle preuve que le ferment mannitique est tout à fait distinct des ferments connus de la tourne et de l'amertume.

4° **Sucre neutre.** — On sait que, sous le nom de sucre neutre, sucre inactif, glucose inactif, sucre de Mitscherlich, on désigne un sucre réducteur qu'on trouve spécialement dans les sucres bruts de canne et dans les mélasses. L'un de nous a montré que sa formation précède toujours celle du sucre interverti normal dans tous les cas d'hydrolyse du saccharose[1] quel que soit le procédé employé, sucrase, acides, chaleur, lumière, etc., et qu'il est constitué par un mélange de glucose et de lévulose, dont les

1. *Bull. de la Soc. chimique*, t. XXXIII, page 256, 1880.

effets sur la lumière polarisée s'annulent exactement. Le dédoublement a été obtenu par l'action physiologique du *mucor circinelloïdes* qui, en vertu de son pouvoir électif pour le glucose, décompose inégalement les deux constituants du sucre neutre [1].

Il était intéressant de rechercher si le ferment mannitique, dont l'action sur le lévulose est si caractéristique et si différente de celle qu'il exerce sur le glucose, permettrait aussi d'analyser le sucre inactif et de faire connaître sa constitution intime.

A cet effet, du sucre brut de canne provenant des Antilles a été lavé avec de l'alcool méthylique pour accroître la proportion de sucre réducteur; après évaporation de l'alcool, le résidu a été dissous dans de l'eau de levure et ensemencé avec le ferment; en même temps, on a fait un essai avec de la mélasse. Les résultats sont consignés ci-après :

Sucre brut des Antilles.

	Saccharose		Sucre réducteur.	
	Poids par litre.	Rotation saccharim.	Poids par litre.	Rotation saccharim.
	Gr.		Gr.	
20 mai.....	26,4	+ 16,2	27,7	0
23 —	»	»	14,6	+ 3,1
24 —	»	»	7,6	+ 3,1
25 —	»	»	3,7	+ 1,5
28 —	26,7	+ 16,4	0	0

Mélasse.

	Saccharose.		Sucre réducteur.	
	Poids par litre.	Rotation saccharim.	Poids par litre.	Rotation saccharim.
	Gr.		Gr.	
20 mai.....	28,7	+ 17,6	23,6	+ 1,6
23 —	»	»	11,0	+ 4,5
24 —	28,8	+ 17,7	6,0	+ 2,1
25 —	»	»	2,9	+ 1,1
28 —	26,6	+ 16,3	0	0

Grâce à cette circonstance que le saccharose était relativement abondant dans la solution, et qu'il est attaqué plus difficilement par le ferment que le lévulose et le glucose, il est resté intact dans les premiers jours de l'expérience, et par suite le sucre

1. *C. R.*, 9 septembre 1878.

neutre a seul fermenté. Or, le tableau ci-dessus montre que la rotation a augmenté vers la droite, pour reprendre ensuite sa valeur initiale au-dessous de laquelle elle n'est descendue qu'à partir du moment où le saccharose commençait à son tour à disparaître. Le sucre neutre se compose donc d'un élément lévogyre, et d'un élément dextrogyre, le premier fermentant plus facilement que le second.

On pourrait supposer *à priori* que ces deux antipodes ne sont autres que le d-glucose et le l-glucose de Fischer, mais cette hypothèse est inadmissible, car on sait que le l-glucose n'est pas fermentescible, et que cependant le sucre inactif fermente en entier sous l'action des levures non inversives. De plus, la liqueur renferme de la mannite; 7gr,32 par litre avec le sucre brut, 6gr,38 avec la mélasse : comme la mannite ne peut provenir que du lévulose, il faut conclure que le sucre neutre étudié se dédouble bien en glucose et lévulose.

5° **Galactose.**— Le galactose étant un isomère stéréochimique du glucose, on doit s'attendre à le voir fermenter comme ce dernier sucre.

Et en effet, il donne les mêmes produits, dans des proportions peu différentes, si les conditions de culture sont les mêmes. C'est ainsi qu'on a trouvé, pour 100 grammes de galactose :

Acide acétique	8,70
— lactique	34,80
Alcool	25,58
Acide carbonique	21,77
— succinique	1,00
Glycérine	9,00
Total	100,85

L'expérience avait été faite avec 21gr, 838 de galactose par litre d'eau de levure.

En variant les essais, les proportions des principaux produits ont elles-mêmes varié dans les limites suivantes :

L'acide acétique	de 5,3	à	10,3 0/0
— lactique	22	—	38,8
L'alcool	25,6	—	30,8
L'acide carbonique	17,2	—	28,8

L'acide volatil est de l'acide acétique pur.

L'acide lactique est de l'acide inactif mélangé avec de petites quantités d'acide gauche, car son sel de zinc a donné :

Rotation saccharimétrique	+ 0,25
Solubilité	1,82
Perte à 160°	18,14

6° **Mannose.** — Quelques essais de fermentation ont été faits avec du mannose cristallisé que M. Bourquelot a bien voulu mettre à notre disposition, et avec du mannose provenant de l'hydrolysation des graines de caroubier, ou encore de la poudre de corrozo traitée d'après les indications mêmes de M. Bourquelot [1], et pour lequel nous avons trouvé : $\alpha = 14°, 35$ au lieu de 14° 36 adopté par Fischer et Hirschberger [2].

Le mannose fermente moins facilement que le glucose ou le galactose; il a fallu deux mois pour en faire disparaître environ 10 grammes par litre en eau de levure. Il se fait de l'acide acétique, de l'acide lactique, de l'acide carbonique et de l'alcool comme avec les autres aldoses, mais toujours en proportion variable avec les conditions de l'expérience. En voici quelques exemples :

	I	II	III	IV
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.
Mannose disparu par litre	9,212	9,617	12,239	11,840
Acide acétique formé par litre	19,22 0/0	8,41 0/0	16,82 0/0	12,83 0/0
— lactique —	18,67	16,24	27,15	27,73
Alcool —	18,89	23,25	20,08	»

L'acide carbonique et les autres produits de la fermentation n'ont pas être dosés. Il ne se forme pas de mannite.

7° **Sorbose.** — Le sorbose présente un intérêt particulier, parce que la plupart de ses propriétés chimiques le rapprochent du lévulose et qu'on le classe, pour cette raison, parmi les cétoses. Grâce à l'obligeance de M. G. Bertrand, que nous sommes heureux de remercier ici, nous avons eu à notre disposition de beaux cristaux de ce sucre, et nous l'avons soumis à l'action du ferment mannitique. Malheureusement, de tous les hexoses, c'est celui qui fermente le plus difficilement, même dans une eau de levure très riche en aliments; aussi n'avons-nous pu jusqu'ici en faire une étude complète.

1. *Société de Biologie*, 28 juillet 1899.
2. L. Maquenne, *Les sucres et principaux dérivés*, page 566.

Sans donner ces chiffres comme définitifs, nous signalerons cependant que nous avons obtenu environ :

10 0/0 d'acide acétique
25 0/0 d'acide lactique
et 30 0/0 d'alcool éthylique.

Les autres produits n'ont pas encore été dosés.

Étant données les relations étroites, d'ordre chimique, physiologique[1] et stéréochimique, qui existent d'une part entre le lévulose et la mannite, et, d'autre part, entre le sorbose et la sorbite, il semblerait qu'on dût avoir ici formation de sorbite; mais, bien que nos recherches à cet égard ne soient pas achevées, l'existence de quantités importantes d'alcool éthylique paraît rapprocher le sorbose non des cétoses, mais bien des aldoses véritables.

III

FERMENTATION DES SACCHAROSES

Les sucres réducteurs à 6 atomes de carbone, aldéhydiques ou cétoniques, ne sont pas les seuls hydrates de carbone attaquables par le ferment mannitique. Nous allons voir en effet que celui-ci décompose également des di- et trisaccharides.

1° **Saccharose.** — Le sucre de canne fermente aussi facilement que le glucose ou le galactose, c'est-à-dire qu'en quelques jours il en peut disparaître 20 grammes environ par litre d'eau de levure. Toutefois, la fermentation ne part bien que si la culture a été largement ensemencée ; avec peu de semence, il y a parfois un retard assez long, voire même absence complète de fermentation, et il faut recommencer l'ensemencement. Le saccharose offre ainsi à l'attaque du ferment une sorte de résistance initiale qui cesse dès qu'une trace de sucre a fermenté.

Les produits sont les mêmes que pour les hexoses aldéhydiques; on a obtenu en effet dans un même essai :

1. G. Bertrand, Préparation biochimique du sorbose (*C. R.* 20 avril 1896).— C. Vincent et Delachanal, Préparation biologique du lévulose au moyen de la mannite (*C. R.*, 8 novembre 1897).

Acide acétique	16,14
— lactique	28,70
Alcool	23,24
Acide carbonique	21,17
— succinique	0,50
Glycérine	6,69
Total	96,44

En ajoutant le poids du ferment, on retrouverait, à très peu près, la totalité du sucre employé, ce qui implique l'absence, en quantité notable, de principes autres que ceux qui précèdent.

Le rapport de l'alcool à l'acide carbonique est égal à 1,10, nombre voisin de celui qu'on a trouvé pour le glucose, et peu différent, par conséquent, de celui que donne la fermentation alcoolique par les levures ordinaires.

En changeant de milieu ou de conditions de culture, on observe des variations assez étendues dans les produits de la fermentation, par exemple :

Pour l'acide acétique	de 7,8	à	17,10/0
— lactique	17,6	—	28,7
Pour l'alcool	17,5	—	23,8
— l'acide carbonique	13,6	—	21,2

Il n'y a pas d'autre acide volatil que l'acide acétique.

L'acide lactique est encore formé d'acide inactif mélangé avec une petite quantité d'acide gauche ; son sel de zinc donne :

Rotation en degrés saccharimétriques	+ 0,25
Solubilité	2,16
Perte à 160°	18,02

La présence de la craie favorise d'une manière très sensible le développement du ferment. Ainsi, avec une même eau de levure, on a fait disparaître : avec craie, 57 grammes de sucre par litre en 13 jours, tandis que, sans craie, il a fallu 9 jours pour n'en faire fermenter que 32 grammes par litre.

Pendant toute la durée de la fermentation, il n'y a pas trace de sucre réducteur, et le dosage du saccharose, par réduction et par rotation, donne les mêmes nombres. Voici un exemple de culture faite en présence de craie.

	Saccharose par litre	
	par rotation	par réduction.
	—	—
	Gr.	
18 mai.....	60,8	»
28 —	56,7	56.5
5 juin.....	42,8	42,4
10 —	37,8	37,1
15 —	22,8	22,9
18 —	13,4	13,7
20 —	10,1	10,4
27 —	3,8	3,8

Même en milieu acide, si la proportion du saccharose n'est pas trop élevée pour que la fermentation puisse être complète, il ne se forme pas de mannite, et, comme dans le cas précédent, le dosage du sucre par rotation donne les mêmes chiffres que par réduction. Exemple :

	Acidité par litre en SO^4H^2	Saccharose par litre	
		pa rotation.	par réduction.
	—	—	—
18 mai.....		22,3	»
28 —	2gr	16,1	15,6
30 —	»	13,4	13,3
5 juin.....		10,4	10,2
10 —	3,92	9,4	9,1
15 —	»	7,5	7,4
18 —	4,21	5,5	5,6
27 —	5,30	2,6	2,5

Le liquide est resté sans action sur la liqueur de Fehling.

Il faut en conclure que le saccharose est attaqué et décomposé sans être préalablement interverti, car, s'il en était autrement, il y aurait production de lévulose et par suite de mannite.

Mais, si la proportion initiale du saccharose est telle que sa fermentation engendre une acidité suffisante, l'acide formé peut hydrolyser partiellement le sucre, et aussitôt la mannite apparaît, en même temps que le milieu devient réducteur et que cesse la concordance dans les dosages du saccharose. C'est ce que montre le tableau suivant où l'on donne en même temps l'acidité croissante de la culture exprimée en acide sulfurique :

	Acidité par litre.	Sucre réducteur par litre.	Saccharose par litre. Par inversion et réduction.	Par rotation.	Observations
	Gr.	—	Gr.	Gr.	—
30 avril.	0,30	Néant.	49,5	50,4	»
9 mai..	3,29	—	39,2	39,1	»
14 mai..	5,67	—	33.0	33,6	»
21 mai..	7,00	—	27,9	28,4	»
6 juin.	8,58	2gr,3	14,8	22,2	Mannite.
20 juin.	8,94	4,5	11,2	17,3	id.
2 août.	9,00	10,3	6,2	11,4	id.

Lorsque 25 grammes environ de sucre ont eu fermenté, le ferment a été notablement gêné dans son développement et, la température de l'étuve et l'acidité aidant, il s'est fait du sucre réducteur; mais comme, dans ces conditions, le glucose est peu attaquable, le lévulose seul a disparu donnant de la mannite, et le pouvoir rotatoire du saccharose non interverti s'est accru de celui du glucose.

L'interversion accidentelle par les acides acétique et lactique, accumulés dans une culture, est donc possible, et d'ailleurs des essais directs ont montré qu'elle se produit réellement aux mêmes doses. Le ferment lui-même en paraît incapable; du moins, les nombreuses tentatives faites pour mettre en évidence son action organique ou diastasique ont échoué. Mis directement en contact avec du saccharose, même jeune et en masse, il n'a jamais modifié le pouvoir rotatoire des solutions sucrées ni fait apparaître des traces de sucre réducteur. La méthode de Fischer en particulier n'a rien donné, même en opérant sur la totalité du ferment provenant de 20 litres de culture de saccharose.

Le ferment mannitique, se comporte donc, vis-à-vis du sucre de canne, comme beaucoup d'autres microbes connus, qui ont la propriété de l'attaquer sans l'intervertir.

Pour les organismes qui ne sécrètent pas de sucrase, mais qui décomposent le glucose et le lévulose de même façon, en donnant les mêmes produits, on peut admettre que l'hydrolysation du saccharose se fait à l'intérieur des cellules, aux dépens d'une diastase non dialysable ou trop peu abondante pour se diffuser; le résultat de la fermentation est alors le même que si l'inversion avait lieu par une diastase extérieure. Mais cette hypothèse est inadmissible pour le ferment mannitique, car si

le saccharose était interverti à l'intérieur de ses cellules, on devrait trouver, dans le liquide de culture, un mélange de mannite et d'alcool; or, on ne trouve que de l'alcool sans mannite; il n'y a donc formation de lévulose ni à l'extérieur ni à l'intérieur de la cellule microbienne;

2° **Maltose.** — Le maltose se comporte sensiblement comme le saccharose et donne les mêmes produits en quantités variables, suivant les conditions de la culture; par exemple :

Pour l'acide acétique	de	6	à 21,7 0/0
— — lactique	de	19,9	— 38,3
— l'alcool		17,9	— 29,2
— l'acide carbonique		19,8	— 26,3

L'équation de la fermentation, dans un cas donné, se déduit du tableau suivant :

Acide acétique	10,50
— lactique	32,25
Alcool	24,01
Acide carbonique	23,31
— succinique	0,65
Glycérine	9,00
Total	99,72

Le rapport de l'alcool à l'acide carbonique est remarquable encore pour ce sucre; il est égal, en effet, à 1,04, c'est-à-dire exactement le même que dans la fermentation par les levures alcooliques.

L'acide acétique est le seul acide volatil engendré, comme pour tous les autres sucres.

Le lactate de zinc se caractérise par les propriétés suivantes :

Rotation saccharimétrique	+ 0,25
Solubilité	1,90
Perte à 160°	17,93

L'acide lactique est donc formé d'acide inactif mélangé avec une petite quantité d'acide gauche.

Pendant la fermentation, il n'y a pas d'hydrolysation du maltose, car le poids du sucre, déduit de son pouvoir réducteur ou de sa déviation saccharimétrique, reste le même pendant toute la durée de la réaction. Une expérience faite dans ce but a donné en effet :

	Acidité en SO^4H^2 par litre.	Maltose par litre. Par réduction.	Par rotation.
	Gr.	Gr.	Gr.
30 avril	0,70	47,15	47,20
8 mai	3,94	31,35	31,04
14 —	4,96	29,87	29,51
29 —	5,49	24,51	24,90

Bien que la culture soit restée un mois à l'étuve, la fermentation n'a pu s'achever, à cause de l'acidité du milieu ; néanmoins la rotation n'a pas diminué, comme il serait arrivé si une partie du maltose s'était hydratée et transformée en glucose.

Il en a été de même pour une fermentation complète obtenue en présence de craie ; on a eu :

	Maltose par litre. Par réduction.	Par rotation.
	Gr.	Gr.
30 avril.....	47,31	47,56
8 mai.....	15,15	15,30
14 —	5,43	5,05
21 —	traces	traces

Le ferment mannitique ne sécrète donc pas de maltose.

3° **Lactose**. — Le lactose, qui est particulièrement réfractaire aux levures alcooliques, offre aussi une certaine résistance au ferment mannitique. Néanmoins, avec un microbe jeune et dans un milieu très nutritif, on parvient à en faire disparaître en 1 mois de 15 à 20 grammes par litre. Une expérience faite avec une eau de levure concentrée a donné :

Acide acétique.....	10,41
— lactique.....	30,26
Alcool.....	34,54
Acide carbonique.....	18,44
Total.....	90,65

Avec la glycérine et l'acide succinique, qui n'ont pas été dosés, on retrouverait tout le sucre initial.

L'acide volatil est de l'acide acétique pur.

L'acide lactique est inactif avec une petite quantité d'acide gauche ; cela résulte des propriétés de son sel de zinc :

Rotation saccharimétrique.....	+ 0,40
Solubilité.....	1,85
Perte à 160°.....	18,1

Comme les autres dissacharides, le lactose fermente sans hydrolysation préalable. Une solution de ce sucre, traitée par la méthode Fischer avec le dépôt de 20 litres de culture, a conservé en effet exactement le même pouvoir rotatoire pendant un séjour de neuf jours à l'étuve.

4° **Raffinose.** — Le raffinose qui nous a servi était un produit pur, car son pouvoir rotatoire, déduit de son pouvoir réducteur après hydrolyse complète et de la déviation saccharimétrique de sa solution, était $\alpha = +105°$ au lieu de $+104°$ d'après Scheibler et de $+105^{e},5$ d'après Schultze[1].

Le raffinose fermente avec la même facilité que le saccharose, c'est-à-dire qu'on peut en faire disparaître de 15 à 20 grammes dans l'eau de levure; mais, comme pour le saccharose, le départ est quelquefois assez pénible.

Bien qu'en fixant 2 molécules d'eau, il se transforme en un mélange de lévulose, de glucose et de galactose, nous n'avons jamais obtenu de mannite ni observé de réduction, d'où il faut conclure que, tout comme le sucre de canne, il est attaqué directement par le ferment mannitique, et que celui-ci ne sécrète pas plus de raffinose que de sucrase ou de maltose[2].

Les produits les plus importants de la fermentation sont encore de l'alcool éthylique, de l'acide acétique, de l'acide lactique et de l'acide carbonique, dont les proportions varient aussi d'une expérience à l'autre. Voici deux exemples de culture en eau de levure :

	I	II
Acide acétique	12,50	12,44
— lactique	35,15	30,90
Alcool	30,58	33,57
Acide carbonique	21,24	22,92
	99,47	99,83

Pour se rendre un compte plus exact de ce que devient le raffinose, il vaut mieux substituer le carbone au sucre lui-même, et l'on trouve ainsi que $43^{gr},86$ de carbone, contenu dans 100 de raffinose, sont représentés par :

1. Maquenne, *Les Sucres et leurs principaux dérivés*, page 707.

2. Cultivé sur du raffinose préalablement traité par les acides, le ferment donne de la mannite, ce qui montre la présence du lévulose dans les produits d'hydrolysation.

		II
	Gr.	Gr.
Carbone de l'acide acétique	5,00	4,98
— — lactique	14,06	12,36
— de l'alcool	15,95	17,51
— l'acide carbonique	5,79	6,25
	40,80	41,10

Il reste 2 grammes environ de carbone qui ont servi à faire de l'acide succinique, de la glycérine et du ferment.

Des essais quantitatifs ont montré que de l'acide succinique et de la glycérine se trouvent bien dans les produits de la fermentation.

L'acide acétique est exempt d'homologues.

Quant à l'acide lactique, il est encore formé par un mélange d'acide inactif et d'une petite quantité d'acide gauche. Son sel de zinc a en effet les propriétés suivantes :

Rotation saccharimétrique	+ 0,25
Solubilité	1,93
Perte à 100°	18,0

En résumé, le raffinose fermente avec la même allure que les autres saccharoses, en se rapprochant un peu plus du lactose que des autres sucres.

IV

FERMENTATION DES PENTOSES

Xylose. — Le seul pentose qui se soit montré sensible à l'action du ferment mannitique est le xylose ; il fermente avec facilité, surtout en présence de la craie ; dans ce cas, il peut en disparaître 50 grammes par litre[1]. Les principaux produits sont de l'acide acétique et de l'acide lactique, avec une petite quantité d'alcool et d'acide carbonique ; on n'a pas trouvé de mannite, et on n'a pas recherché la glycérine ni l'acide succinique.

Les proportions d'acides acétique et lactique obtenus dans divers essais ont été :

1. Le xylose qui a servi dans nos essais avait pour pouvoir rotatoire $\alpha = + 20°,2$.

	I	II	III	IV
Acide acétique.....	41,90	42,32	38,96	
— lactique.....	44,70	43,90	45,64	41,26
	86,60	86,22	84,60	

Ils représentent 85 0/0 environ du xylose employé ; d'après l'équation

$$C^5H^{10}O^5 = C^3H^6O^3 + C^2H^4O^2$$

ils devraient être dans le rapport de $\frac{90}{60} = 1,5$ tandis que l'acide lactique est à peine supérieur à l'acide acétique.

L'acide acétique est pur d'homologues.

L'acide lactique est de l'acide inactif mélangé avec une petite quantité d'acide gauche ; son sel de zinc donne en effet :

Rotation saccharimétrique.....	+ 0,20
Solubilité.....	1,96
Perte à 160°.....	18,10

En faisant les cultures dans le vide avec toutes les précautions indiquées dans l'étude du lévulose, on a pu recueillir et mesurer l'acide carbonique produit pendant la fermentation du xylose. Cet acide est très peu abondant; nous avons trouvé, en effet, dans deux essais :

	Poids du xylose fermenté.	Proportion de CO^2 produit.
	Gr.	
1.....	9,609	0,62 0/0
2.....	25,614	0,57

En distillant le liquide fermenté, on constate très nettement les gouttelettes huileuses de l'alcool éthylique, et en concentrant davantage, on le caractérise d'une manière complète. Son dosage est plus incertain parce qu'il est relativement peu abondant.

Le xylose se comporte donc comme un sucre aldéhydique, conformément à sa formule stéréochimique.

V

RÉSUMÉ

1. En résumé, le ferment que nous avons étudié ne donne de mannite qu'avec le lévulose ; avec tous les autres sucres atta-

quables par lui, il se fait de l'alcool éthylique qui, comme la mannite, est plus hydrogéné que le sucre initial. Dans tous les cas, on trouve en outre de l'acide carbonique, de l'acide acétique, lactique, succinique et de la glycérine.

2. La production d'alcool par les microbes, en dehors des levures proprement dites et des moisissures, a été signalée pour la première fois, en 1879, par M. Duclaux[1], qui l'obtint aux dépens du sucre de lait par le *Tyrothrix claviformis* et par l'*Actinobacter polymorphus*. Depuis lors, on en a obtenu avec un grand nombre de bacilles dont les plus connus sont le *B. ethaceticus*[2] et le *B. ethacetosuccinicus* de Frankland[3], le *Saccharobacillus pastorianus* de Van Laer[4], le *Pneumocoque* de Friedländer[5], etc.

3. Le ferment mannitique se distingue de tous ces microbes en ce qu'il n'attaque pas indifféremment les sucres et les alcools, et qu'il donne les mêmes produits avec des composés voisins, tels que glucose et galactose, saccharose et lactose.

En outre, il forme toujours, à la fois, de la glycérine et de l'acide succinique, tandis que, de ces deux corps, le dernier seul a été signalé, par exemple dans les cultures de *B. ethaceticus* ou de Pneumocoque.

4. La production simultanée d'alcool ordinaire, d'acide carbonique, de glycérine et d'acide succinique, presque exactement dans les proportions de la fermentation alcoolique normale, montre qu'une partie du sucre se décompose comme s'il était soumis à l'action de la levure de bière ; mais, en aucun cas, la totalité du sucre n'a pu subir cette transformation; une forte proportion se dédouble en acide acétique et en acide lactique, sans que l'un quelconque de ces deux acides puisse se produire seul.

5. Les seuls sucres susceptibles, d'après Fischer[6], de fermenter directement avec la levure, le d-fructose (lévulose), le d-glucose, le d-galactose et le d-mannose, sont également décomposables par le ferment mannitique. A cet égard, le pou-

1. *An. de l'Institut agronomique*, 4e année, 1879-1880, page 103.
2. *An. de l'Institut Pasteur*, VI, page 653, 1892.
3. *Bull. de la Soc. Chim.* (3), X, page 332, 1893.
4. *Mém. de l'Acad. Royale de Belgique*, XLVII, 1892.
5. *Soc. de Pharm. et de Chim.* (6), II, page 529, 1875 ; *Bull. de la Soc. Chim.* (3), XV, page 94, 1896.
6. *Zeits. f. Physiol.*, XXVI, page 60.

voir analytique de ce dernier est comparable à celui du *Saccharomyces*, mais il est encore plus grand, puisque la molécule même du sorbose est attaquée et disloquée. Bien plus, un sucre en C^5, le xylose, est décomposé tandis que la levure n'agit que sur des sucres en C^3, C^6, C^{12}, C^{18}.

Il serait évidemment intéressant d'étudier l'action de notre microbe sur les antipodes des hexoses fermentescibles et sur les autres isomères de Fischer; malheureusement, nous n'avons pas encore pu nous en procurer.

6. Si l'on remarque que le pentose qui s'est montré sensible au ferment mannitique est le l-xylose, et que par lui on peut s'élever au groupe des isomères symétriques des hexoses fermentescibles, on peut espérer que certains de ces isomères pourront aussi fermenter dans des conditions convenables.

Son isomère, le l-arabinose, s'est montré réfractaire au ferment mannitique, comme il l'est à la levure; peut-être le d-arabinose serait-il plus facile à décomposer?

7. Le xylose et l'arabinose présentent ici des différences radicales, caractéristiques, tandis qu'avec d'autres microbes, le Pneumocoque de Friedländer, par exemple, comme l'a montré M. Grimbert, ils sont attaqués tous les deux et ne diffèrent que par quelques-uns des produits de leur transformation [1].

8. Les saccharides : saccharose, maltose, lactose et raffinose fermentent directement sans avoir besoin d'être hydratés et transformés en hexoses.

9. Comme avec d'autres infiniment petits, notamment les ferments lactiques étudiés par M. Kayser [2] et par M. Pottevin [3], les proportions des produits engendrés aux dépens d'un même sucre varient beaucoup avec la nature du milieu, la qualité des aliments, l'âge ou l'abondance du ferment, en un mot avec les conditions physiques et chimiques de la culture. Toutefois, l'acide lactique n'a pas changé de signe comme il est arrivé dans les essais de M. Péré sur le ferment lactique [4].

10. La véritable propriété spécifique de notre ferment est de faire de la mannite avec le lévulose *seul*. Il en résulte qu'avec lui on peut caractériser ce sucre dans des mélanges fermentes-

1. *Bul. de la Soc. Chim.* (3) XV, page 340, 1896.
2. *An. Inst. Pasteur*, VIII, page 737, 1894.
3. *An. Inst. Pasteur*, XII, page 49, 1898
4. *An. Inst. Pasteur*, XII, page 63, 1898.

cibles, lorsque, par exemple, plusieurs hexoses prennent simultanément naissance par hydrolyse des saccharides ou par tout autre procédé. Cette propriété a été mise à profit dans l'étude du sucre interverti, du sucre neutre et des produits d'hydratation du raffinose.

11. La même propriété nous a permis de confirmer les résultats fournis par l'analyse chimique et par l'observation saccharimétrique, et de démontrer par une nouvelle preuve que le ferment mannitique ne sécrète pas de ferment inversif ou similaires et qu'il se nourrit du saccharose, du maltose, du lactose et du raffinose sans hydrolysation préalable.

12. Enfin, toutes les constatations que nous avons faites au cours de ce nouveau travail ont confirmé nos premières recherches, à savoir que notre ferment mannitique était distinct du ferment de la tourne et du ferment de l'amertume, et que l'altération causée par lui dans les vins ne peut être confondue avec les deux autres maladies.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CAUSALE DES MODIFICATIONS D'ÉTAT DES COLLOIDES

SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

DE LA

MICELLE ALBUMINOÏDE

PAR LE Dr SWIGEL POSTERNAK[1]

XII

SUR LES PHÉNOMÈNES DE COAGULATION

Le mécanisme de la précipitation par formation d'une couche périmicellaire une fois accepté, le problème de la coagulation nous paraît singulièrement simplifié. On désigne sous ce dernier nom une modification d'état des colloïdes provoquée par des agents immatériels, comme la chaleur, l'électricité, ou par des matières agissant à doses infinitésimales, comme les diastases coagulantes, et ayant pour résultat la formation d'un précipité insoluble dans le milieu qui dissolvait le colloïde en question avant l'application des agents susdits. C'est en s'appuyant sur ce résultat qu'on a pu définir la coagulation comme une précipitation non réversible des colloïdes.

Cette définition, qui suppose un rapport de cause à effet entre l'agent coagulant et la non-réversibilité du phénomène, tout en étant applicable à la coagulation des milieux physiologiques tels que le sérum ou le blanc d'œuf, ne s'adapte pas bien aux albuminoïdes isolés et aux colloïdes en général.

La chaleur, agent coagulant par excellence, dissolvait dans nos expériences les précipités obtenus avec des sels dans les solutions acides des albuminoïdes. Ces précipités réapparaissaient après refroidissement, en manifestant ainsi une réversibilité des plus prononcées.

1. (*Suite.*) Voir les nos de février, de mars et de juin de ces *Annales*.

Il est possible de montrer, d'un autre côté, que la non-réversibilité de la précipitation peut être obtenue dans des conditions ne rappelant en rien la coagulation véritable.

La solution opalescente du blanc d'œuf dilué et chauffé à 70° précipite à froid, comme nous le savons, lorsqu'on la neutralise avec de l'acide chlorhydrique. Le précipité est soluble dans les acides faibles et les alcalis. En ajoutant à cette solution de la soude jusqu'à la concentration de 1 0/0, et en neutralisant de nouveau avec la quantité d'acide chlorhydrique calculée, on obtient un précipité qui, filtré et lavé à l'eau distillée, ne se dissout plus ni dans les acides ni dans les alcalis : il est donc coagulé. Si l'on ajoute de la soude à 1 0/00 seulement, le précipité est insoluble dans les acides faibles, mais facilement soluble dans les alcalis.

A quoi peut bien être due cette précipitation non réversible par neutralisation d'une solution de soude à 1 0/0 ? Le chlorure de sodium formé en plus grande quantité ne joue certainement aucun rôle dans la production de ce phénomène : l'albuminoïde du blanc d'œuf en solution alcaline ne précipite pas sous l'influence des sels alcalins. On aurait pu, d'ailleurs, obtenir une solution de cet albuminoïde aussi dans HCl, si au lieu de neutraliser exactement la soude, on avait ajouté du même coup un petit excès d'acide. C'est, par conséquent, *au moment même de la précipitation* que l'albuminoïde acquiert la propriété de résister à l'action solubilisante des acides et des alcalis.

L'explication la plus plausible du phénomène en question nous semble la suivante. La soude à 1 0/0, étant plus riche en ions $\overline{\text{OH}}$ que le même réactif à 1 0/00, diminue plus fortement les micelles albuminoïdes. En neutralisant exactement l'alcali, on fait revenir les micelles très contractées à leur volume naturel par une détente plus énergique et plus brusque. Or, il doit se passer entre les micelles albuminoïdes lancées les unes contre les autres avec force ce qu'on observerait dans les mêmes conditions avec des substances moyennement résistantes, mais parfaitement malléables : elles ne formeraient plus qu'une seule masse, difficile à séparer en ses parties constituantes.

Les phénomènes de coagulation par la chaleur semblent ne pas avoir d'autre mécanisme que celui que nous venons d'indiquer. Si l'action de la température est assez brusque, les

flocons formés auront une structure plus compacte et seront insolubles. Le même albuminoïde donnera une précipitation réversible lorsque l'élévation de la température sera lente et ménagée. C'est ce que démontrent les expériences de MM. Corin, Bérard et Ansiaux avec le sérum sanguin et le blanc d'œuf, citées plus haut.

On peut invoquer en faveur de cette explication encore la remarque suivante. On n'obtient à froid des précipités albuminoïdes insolubles que dans le cas ou l'élasticité micellaire et, par conséquent, la contraction sous l'influence d'un agent solubilisant, est très grande. Si l'on répète en effet les expériences de tout à l'heure avec les albuminoïdes du lupin blanc ou jaune, les précipités, obtenus par neutralisation de la soude à 1 0/0, sont parfaitement solubles dans les acides et les alcalis. En rapport avec cette constatation se trouve sans doute la solubilité dans les alcalis faibles, même à froid, des coagula des albuminoïdes des lupins, provoqués par la chaleur.

La non-réversibilité d'une précipitation ne dépend donc pas directement de l'agent coagulant, mais se rattache surtout à l'élasticité micellaire du colloïde, et à la façon brusque de la mettre en jeu.

Ceci étant spécifié, on peut, en s'appuyant sur la notion, bien démontrée depuis les recherches de A. Schmidt, de Harnack et de Starke, que la coagulation est impossible en l'absence des matières minérales [1], considérer la coagulation par la chaleur, la seule que nous aurons en vue ici, comme un cas spécial de précipitation saline, celui notamment où la concentration précipitante est moins grande à chaud qu'à froid, où, en d'autres termes, le quotient b/a est au dessous de l'unité. — La valeur b représente naturellement la concentration saline dans le milieu où se trouve le colloïde qu'on cherche à coaguler.

Il découle de cette conception un certain nombre de conséquences que nous résumerons brièvement.

En ce qui concerne les *meilleures conditions de la coagulation par la chaleur*, il est à remarquer qu'il serait impossible d'indiquer *a priori* une règle générale pour tous les colloïdes ou albunoïdes connus. En examinant les nombres communiqués dans

1. On a vu plus haut que les matières minérales peuvent être remplacées par la peptone de Witte et probablement par d'autres corps organiques.

ce travail, on s'aperçoit facilement que les conditions d'apparition du quotient $b/a < 1$ ne sont pas les mêmes pour les différents albuminoïdes étudiés par nous, et qu'elles seront probablement différentes pour d'autres matières protéiques. Pour les colloïdes diélectriques à grande élasticité micellaire, les meilleures conditions seront représentées par un milieu acide en présence des chlorures, comme nous l'avons vu pour le blanc d'œuf. Pour les matières dont la grosseur et l'élasticité micellaires sont analogues à celles des albuminoïdes de réserve du sapin rouge, c'est le milieu faiblement alcalin ou ammoniacal qui sera le plus propice à la coagulation. Enfin, pour les corps se rapprochant, par les propriétés physiques de leurs micelles, des albuminoïdes du lupin blanc, ce n'est qu'en présence de l'ammoniaque très faible que la coagulation pourra être réalisée.

La recommandation, très en honneur dans la chimie biologique, d'acidifier avec l'acide acétique le milieu dans lequel on cherche à provoquer une coagulation par la chaleur est, par conséquent, trop absolue et n'est guère applicable avec succès que dans le premier des cas étudiés. C'est l'application stricte de cette recommandation qui a conduit M. Vines et M. Martin à leur opinion sur l'existence des albumoses dans les graines de semence. En chauffant les extraits aqueux des graines, légèrement acidifiés avec de l'acide acétique, ces auteurs ont remarqué qu'une grande quantité d'albuminoïdes reste en solution, même à la température d'ébullition. Ne se doutant pas du rôle solubilisant exagéré de l'acide à chaud et de la complexité du problème de la coagulation, ils ont pris les albuminoïdes restés en solution pour des albumoses.

En ce qui concerne la *température de coagulation*, que les auteurs d'il y a vingt ans cherchaient à déterminer avec beaucoup de soin, croyant posséder en elle un moyen physique pour l'identification des matières protéiques, il résulte des notions développées dans ce travail, conformément d'ailleurs, aux conclusions tirées par M. Duclaux [1] de ses études sur la coagulation des phosphates bicalciques, que la température au moment de l'apparition du coagulum dans une solution albuminoïde chauffée est subordonnée à un nombre de facteurs trop grand, pour qu'on

1. *Ces Annales*, t. VII, p. 641.

puisse en conclure quoi que ce soit sur la nature de l'albuminoïde coagulé.

La température ne favorise en effet la coagulation que par la dilatation qu'elle imprime aux micelles. Elle leur donne la possibilité de s'entourer d'une zone protectrice aux dépens de la concentration saline en présence dans le liquide. Or, la température de coagulation augmentera pour le même albuminoïde avec la diminution de la concentration du sel [1], la micelle étant forcée de se dilater davantage pour pouvoir se précipiter. Elle augmentera aussi avec la diminution de la concentration de l'albuminoïde, les concentrations précipitantes des sels s'élevant dans ces conditions, comme nous l'avons montré p. 112. Elle variera enfin avec la nature des sels en présence (différence dans la valeur absolue des quotients b/a pour le même albuminoïde), et sous l'influence d'autres substances concomitantes, spécifiques ou non (diastases coagulantes et décoagulantes, polysaccharides, etc., etc.).

Nous terminons par ces remarques notre étude causale sur les modifications d'état des colloïdes.

Une question importante et très délicate, sur le rapport des propriétés physiques de la micelle colloïde et la constitution chimique du corps dont elle dérive, vient se greffer sur le sujet qui nous a occupé jusqu'ici. Dans sa communication sur les matières albuminoïdes au dernier congrès de physiologie à Cambridge, M. Kossel [2], après avoir résumé ses travaux, remontant déjà à une quinzaine d'années, sur l'histone, s'exprime entre autres de la façon suivante :

« On trouve de ces corps riches en azote également chez les plantes, et il est impossible de douter que les matières albuminoïdes des graines de conifères qui contiennent 18,51 0/0 d'azote et une quantité particulièrement grande de produits de décomposition basique, suivant les études de M. E. Schulze, ne soient en rapport très rapproché avec les histones d'origine animale. »

1. Ce point semble en contradiction avec les nombres de M. Pauli (Sur les modifications d'état des albuminoïdes, *Pflüger's Archiv*, t. LXXXIII, p. 315, 1899). Mais les expériences de cet auteur, ayant été exécutées avec le blanc d'œuf naturel, les conclusions à en tirer me paraissent devoir être rapportées surtout à l'influence des sels sur la température de destruction de l'albuminase.

2. *Deutsche Med. Wochenschrift*, 1898, nº 37.

Comme il ressort des autres travaux du même auteur que la richesse en produits de décomposition basique est en relation avec la réaction la plus caractéristique des histones, notamment l'insolubilité du précipité provoqué par l'ammoniaque dans ses solutions dans HCl à 0.8 0/0, dans un excès de ce dernier réactif, on sera frappé de voir que nos recherches sur les albuminoïdes de *Picea excelsa*, qui sont précipitables par les sels, même en solution dans l'ammoniaque assez concentrée, viennent confirmer les prévisions de M. Kossel sur la parenté des albuminoïdes des conifères avec l'histone. Est-ce une coïncidence fortuite, ou peut-on réellement, par la connaissance d'un détail de la constitution chimique de la molécule albuminoïde, prévoir les réactions physiques de ce dernier corps? C'est ce sujet que nous allons examiner dans le dernier chapitre de ce travail.

XIII

LA THÉORIE DE L'HISTONE DE M. KOSSEL ET REMARQUES SUR LA CHIMIE CELLULAIRE

La théorie de l'histone cherche à relier causalement les réactions physiques d'un albuminoïde de provenance cellulaire non seulement avec la constitution chimique de ses molécules, mais aussi avec la place précise qu'il occupe dans l'organisme élémentaire dont on le retire.

L'histone serait, en effet, un albuminoïde d'origine nucléaire et de nature basique. Ce dernier caractère chimique, supposé en rapport avec la richesse de la molécule de l'histone en chaînons basiques (bases hexoniques et autres), donnerait, d'une part, un cachet particulier aux réactions de solubilisation et de précipitation du corps en question, et déterminerait, d'autre part, la fonction qu'il a à remplir dans le noyau cellulaire, notamment la saturation de l'acidité hypothétique de la nucléine. L'histone concourrait ainsi à la formation de la nucléo-histone, substance complexe, mais bien définie — sa formule schématique fut tracée à deux reprises par M. Lilienfeld — dont se composerait essentiellement le noyau d'une cellule.

La conception de l'histone, comme presque tout ce qui a été

écrit par les chimistes sur la chimie cellulaire, trouve son point de départ dans le travail de M. Miescher[1] sur les spermatozoïdes du saumon et plus que toute autre chose elle porte l'empreinte des idées développées pour la première fois par cet auteur.

M. Miescher a soumis, comme on sait, les spermatozoïdes du saumon, épuisés avec de l'alcool et de l'éther, à l'extraction consécutive avec l'acide chlorhydrique faible et avec la soude. L'extrait acide contenait un corps azoté d'un type inconnu jusqu'alors et qui fut appelé *protamine*[2] ; l'extrait alcalin, mélangé avec son volume d'alcool, permit d'isoler par précipitation avec l'acide chlorhydrique une matière phosphorée qui, bien que composée principalement de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène, ne possédait aucune des réactions des albumi-

1. *Verhandl. d. naturf. Gesel. zu Basel*, t. VI, p. 138, 1874.

2. La protamine fut ce dernier temps l'objet de nombreuses études. On connaît aujourd'hui toute une série de corps, analogues par leurs propriétés à la protamine du saumon ou salmine, suivant la dénomination de M. Kossel. Ce dernier auteur a isolé la clupéine et la sturine des testicules du hareng et de l'esturgeon (*Z. f. physiol. Ch.*, t. XXII, p. 176 ; t. XXV, p. 165).

M. Kurajeff a préparé la scombrine et une autre protamine des organes mâles du maquereau et de *Acipenser Stellatus* (*Ibid.*, t. XXVI, p. 524; t. XXXII, p. 197).

M. Morkowin, la cycloptérine des spermatozoïdes du *Cyclopterus lumpus* (*Ibid.*, t. XXVIII, p. 313).

Toutes ces protamines peuvent être séparées en combinaison avec l'acide sulfurique sous forme d'une huile brunâtre, par refroidissement de leur solution dans l'eau chaude. Elles contiennent jusqu'à 30 pour cent d'azote et donnent la réaction du biuret. La réaction de Millon reste négative, sauf pour la cycloptérine qui la présente de la façon la plus nette. C'est, d'ailleurs, la seule des protamines connues qui donne de la tyrosine à l'hydrolyse.

Les recherches de M. Kossel sur le dédoublement de ces corps ont fait penser tout d'abord que la sturine, la clupéine et la salmine sont constituées uniquement par l'arginine, l'histidine et la lysine, bases dites hexoniques parce qu'elles contiennent chacune six atomes de carbone. Les études ultérieures du même auteur (*Z. f. physiol. Ch.*, t. XXVI, p. 588) ont toutefois montré qu'il se forme, en outre de ces protamines, encore d'autres produits de décomposition, dont un acide amidovalérique a pu être isolé à l'état cristallisé. Des trois bases hexoniques, on n'a retrouvé que l'arginine parmi les produits d'hydrolyse de la salmine et de la clupéine.

D'après les recherches récentes de MM. Kossel et Kutscher (*Ibidem*, t. XXXI, p. 165), l'arginine semble former une partie très importante des produits de dédoublement de toutes les protamines. On en trouverait 58,2 0/0 du poids de la sturine, 82,1 0/0 de celui de la clupéine, 84,3 0/0 de celui de la salmine, et 67,7 0/0 dans la cycloptérine. Il est nécessaire cependant de faire remarquer que ces nombres sont calculés non sur le poids d'arginine isolée en nature, mais sur la teneur en azote de la fraction d'arginine, que l'on obtient en appliquant à la séparation des bases hexoniques la méthode proposée par M. Kossel, notamment la précipitation de l'arginine par la sulfate d'argent et la baryte. Comme il peut y avoir une foule d'autres corps azotés qui précipitent dans les mêmes conditions, il nous paraît indiqué d'attendre des résultats plus précis avant de se prononcer sur la composition simple des protamines.

noïdes. C'était ce que Miescher a désigné sous le nom de *nucléine* et qu'on appelle, depuis le travail de M. Altmann sur l'acide nucléique, sous ce dernier nom, en réservant le premier aux matières nucléiques contenant encore des albuminoïdes difficiles ou impossibles à séparer.

Les deux corps isolés des extraits des spermatozoïdes furent étudiés au point de vue de leur précipitation sous l'influence de différents réactifs et analysés. Parmi les nombreuses réactions auxquelles ils se prêtent, nous signalerons la précipitation mutuelle des solutions aqueuses de la nucléine et de la protamine. L'analyse amena à la formule $C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$ pour le premier de ces corps, et $C_9H_{21}N_5O_3$ pour le second.

Tels sont les faits qui ont conduit M. Miescher à supposer :

1. Ces constatations venaient confirmer l'existence réelle des matières phosphoro-organiques, solubles dans les alcalis, insolubles dans les acides, que M. Miescher avait découverts en 1869 dans le résidu de digestion pepsique des globules de pus (*Hoppe-Seyler's Med. Chem. Unters.*, p. 441) et qui furent retrouvées à la même époque par M. Plosz (*Ibid.*, p. 461) dans les stromas nucléés des globules rouges d'oie, et par Hoppe-Seyler (*Ibid.*, p. 500) dans la levure.

Les recherches bien connues de M. Kossel et de ses élèves sur les produits de dédoublement des nucléines ont fait ressortir une différence fondamentale entre les groupements azotés qui participent à la constitution de ces matières et ceux qui contribuent à la formation de la molécule albuminoïde proprement dite.

Tandis qu'on a obtenu jusqu'ici par hydrolyse des albuminoïdes, soit à l'aide des acides, soit à l'aide de la trypsine en solution alcaline, l'ammoniaque, les acides amidés tels que la glycocolle, la leucine (acide amidoisobutylacétique, d'après E. Schulze et Ziekernik, *Z. f. physiol. Ch.*, t. XVII, p. 513, 1893), l'acide aspartique et glutamique, la tyrosine et la phénylolanine (E. Schulze, *Ibidem*, t. IX, p. 63); ce corps formait probablement la plus grande partie de la tyroleucine de M. Schützemberger (*C. r.*, t. LXXXIV, p. 124), les acides diamidoacétique (Drechsel, *Ber. d. math. p. hys. Cl. de K. Sächs. Gesel. d. Wiss.*, 1892, p. 115) et diamidocaproïque, ce dernier étant connu sous le nom de lysine (Drechsel, *Arch. f. physiol. u. Anat. Physiol. Abt.*, 1891, p. 248), l'arginine ou l'acide guanidinamidovalérique, qui fut isolé des albuminoïdes pour la première fois par M. Hedin (*Z. f. physiol. Ch.*, t. XX, p. 186; t. XXI, p. 154) et dont la constitution fut élucidée par MM. E. Schulze et E. Winterstein (*Ibidem*, t. XXVI, p. 1), l'histidine (A. Kossel, *loc. cit.*; Hedin, *Z. f. physiol. Ch.*, t. XXII, p. 191), et, enfin, la cystine (disulfide de l'acide amidoéthylidenlactique), — nous ne parlons ici que des substances dont le caractère défini ne fait plus de doute, — on a pu isoler aux dépens des nucléines les dérivés de la purine tels que l'adénine $C_5H_5N_5$, l'hypoxanthine $C_5H_4N_4O$, la guanine $C_5H_5N_5O$ et la xanthine $C_5H_4N_4O_2$, bases qui se trouvent, comme on sait, en rapport très étroit avec l'acide urique $C_5H_4N_4O_3$ (A. Kossel, *Z. f. physiol. Ch.*, t. III, p. 284; t. V, p. 152 et 267; t. VI, p. 422; t. VII, p. 7; t. VIII, p. 404; t. X, p. 248), ensuite, un corps neutre, la thymine $C_5H_6N_2O_2$, et une base, la cytosine $C_{21}H_{30}N_{16}O_4$ (A. Kossel et A. Neumann, *Ber. d. D. Ch. ges.*, 1894, p. 2215.)

Les bases xanthiques peuvent être isolées des matériaux cellulaires de différente provenance. Il résulte des recherches de M. Tichomiroff (*Z. f. physiol. Ch.*, t. X, p. 518) sur les œufs du ver à soie, et de M. Kossel sur les œufs de poule, que la quantité de ces bases isolées croît avec le développement de l'embryon, ce qui plaide en faveur de leur origine protoplasmatique.

1° que les corps qu'il a eus entre les mains présentaient des individualités chimiques, et 2° que la nucléine et la protamine, isolées par lui, étaient combinées sous forme d'un sel dans la tête des spermatozoïdes. Cette dernière formation, considérée au point de vue chimique, ne serait, par conséquent, d'après lui, qu'un nucléate de protamine.

Il serait superflu, je suppose, d'entrer dans de longs développements pour démontrer que cette conclusion est difficile à mettre d'accord avec la notion de l'*organisation* du protoplasma — base de toutes nos considérations biologiques à l'heure actuelle.

Il y a déjà fort longtemps que l'on a cessé d'identifier l'organisation de la cellule avec sa différenciation morphologique telle qu'elle nous apparaît au microscope[1]. Un chloroplaste d'une cellule verte, malgré son exiguïté et son aspect uniforme, est le siège des processus physiologiques très variés dont le chimisme est si compliqué qu'il est nécessaire, si l'on veut rattacher chaque fonction à un substratum matériel approprié, de reculer la limite de l'organisation du côté du domaine moléculaire. Il en résulte qu'à l'encontre des substances qu'étudie le chimiste, le protoplasma n'est pas constitué par des particules identiques au point de vue chimique, mais par un ensemble d'unités fort dissemblables, reliées entre elles suivant des lois qui sont encore à trouver[2].

L'idée de l'organisation suppose donc que lorsqu'on soumet une formation protoplasmatique à la dissolution, ce n'est pas une matière définie que l'on obtient en solution, comme le veut M. Miescher pour les spermatozoïdes du saumon, mais un mélange d'un nombre très considérable sinon infini d'individualités chimiques.

On peut se demander alors : faut-il admettre, en s'appuyant sur les conclusions de M. Miescher, que les spermatozoïdes du saumon font exception à la règle générale de l'organisation des cellules, comme l'a supposé, par exemple, M. Schmiedeberg encore en 1896[3], ou faut-il, au contraire, conclure, pour ne pas rompre délibérement avec les enseignements de la biologie,

1. E. Bruck, Die Elementarorganismen. *Sitzber. d. math. natur. Cl. d. Akad. d. Wiss. zu Wien*, t. XLIV, p. 381, 1861.

2. Comp. les belles pages consacrées à cette question par H. de Vries, *Intracellulare Pangenesis*, Jena, G. Fischer, 1889, p. 34-40.

3. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmak.*, t. XXXVII, p. 149.

que les idées de M. Miescher sont basées sur une interprétation inexacte de ses observations? Le choix à faire ne nous semble pas douteux.

M. Miescher admet que la nucléine et la protamine sont des corps définis. Rien ne s'opposait pourtant à ce que ces matières ou du moins une d'elles fût considérée comme un mélange sans bornes. Il n'existe pas, comme on sait, de critérium pour reconnaître une individualité chimique lorsqu'il s'agit des colloïdes amorphes de constitution chimique très compliquée.

La chimie des albuminoïdes possède, il est vrai, dans sa classification, des espèces différentes, mais leur distinction, comme le montre déjà la nomenclature, dépend moins de l'adresse et du savoir du chimiste que de la prévoyance de la nature qui a eu soin de placer les différentes matières protéiques dans les organes variés et chez différentes espèces d'être vivants. Il suffirait de mélanger les corps appartenant au même groupe et se rapprochant, par conséquent, par les conditions de leur solubilité, comme l'ovalbumine, la lactalbumine et la sérumalbumine, ou la maïzine, la phaséoline et la vignine, ou encore l'acide thymonucléique, myconucléique et salmonucléique, et ainsi de suite, pour que nous les prenions pour une seule individualité chimique, si les mélanges étaient effectués à notre insu.

La concordance des nombres obtenus à l'analyse qui est, d'ailleurs, loin d'être prouvée pour la nucléine et la protamine du saumon[1], ne peut pas servir d'argument contre l'hypothèse

1. A côté de la formule de M. Miescher pour la salmine, indiquée plus haut, nous en possédons une de M. Piccard (*Ber. d. D. Ch. Gesel.*, 1874, t. 7, p. 1714), $C_{16}H_{52}N_9O_4$; une de M. Schmiedeberg): $C_{16}H_{54}N_9O_2$; une de M. Kossel: $C_{16}H_{28}N_9O_3$.

M. Schmiedeberg exprime la composition de l'acide salmonucléique par la formule $C_{40}H_{54}N_{14}O_{16}.2P_2O_5$ au lieu de $C_{29}H_{49}N_9P_3O_{22}$, donnée par Miescher.

En s'adressant à une autre méthode de préparation de l'acide en question (précipitation à l'aide des sels de cuivre en présence d'un alcali), M. Schmiedeberg fut obligé d'avoir recours, pour mettre en concordance les nombres obtenus à l'analyse avec sa formule, aux expressions compliquées dont voici quelques exemples :

$$7\,(C_{40}H_{52}Cu_2N_{14}O_{16}.2P_2O_5) + (C_{40}H_{49}Cu_3{}^1/_2N_{14}O_{16}.2P_2O_5) \text{ ou encore}$$
$$C_{40}H_{52}Cu_2N_{14}O_{16}.2P_2O_5 + Cu_{40}H_{54}CuN_{14}O_{16}.2P_2O_5 + C_5H_5N_5 + 10H_2O, \text{ etc.}$$

(*Arch. f. exper. Path. u. Pharmak.*, t. XLIII, p. 57, 1899.)

Le procédé, à défaut d'être élégant ou rigoureux au point de vue scientifique, est extrêmement commode. Il a permis à M. Herlont, élève de M. Schmiedeberg (*Ibidem*, t. XLIV, p. 148, 1900), de démontrer l'identité de l'acide nucléique isolé du thymus du veau avec celui des spermatozoïdes du saumon aux différentes études de leur maturité. Identité d'autant plus surprenante que l'hémoglobine ou la caséine de lait, albuminoïdes dont l'infériorité au point de vue biologique

d'un mélange, du moment que ce dernier est supposé bien uniforme. Le nombre d'erreurs qu'a occasionnées une confiance trop grande dans les résultats d'analyse des corps amorphes est déjà si notable dans la littérature — nous n'en citerons que l'exemple récent de l'antipeptone — qu'il serait inutile d'y insister davantage.

D'un autre côté, la conclusion de M. Miescher sur la nature chimique de la mucléine et de la protamine, et sur la combinaison saline entre elles, est basée uniquement sur leur solubilisation dans les acides et les alcalis et la précipitation mutuelle de leurs solutions. Or, tout notre travail, qui est né justement du désir d'élucider les conceptions histochimiques en cours, soit dit en passant, tend à démontrer, comme on l'a vu, qu'il n'existe aucune relation entre la nature chimique des corps et les phénomènes de modification de leur état, et que la précipitation des colloïdes n'est pas une manifestation d'une réaction chimique, mais de l'affinité adhésive des micelles.

D'ailleurs, les idées de M. Miescher, appliquées à un animal entier, saigné à blanc, finement haché et soumis au même traitement que les spermatozoïdes dans les expériences que nous venons d'analyser, ne nous amèneraient-elles pas, de même que dans le cas des cellules mâles de reproduction du saumon, à la conclusion qu'un lapin, par exemple, est constitué chimiquement par une combinaison saline entre une léponucléine et une lépoalbumine. Le peu de probabilité de cette conclusion n'a guère besoin d'être démontré. A elle seule elle suffirait pour nous convaincre qu'entre la notion de l'organisation et les idées de M. Miescher sur la constitution chimique des spermatozoïdes du saumon, nos préférences doivent se porter sur la première.

C'est cependant de ces idées qu'est née la théorie de l'histone. M. Kossel écrit dans son travail de 1884, où furent posées les premières assises de cette théorie : « Par des recherches antérieures je fus amené à la présomption que la nucléine est combinée chimiquement dans le noyau cellulaire avec d'autres corps. Les nucléines montrent, comme on sait, des propriétés acides, et on pouvait s'attendre à ce qu'une extraction (d'un matériel nucléé) avec des acides dilués permît d'isoler une substance de nature basique ».

comparativement aux matières composant les noyaux cellulaires ne sera niée par personne, se montrent différentes même chez les espèces très rapprochées.

En effet, en traitant les stromas nucléés des globules rouges d'oie avec de l'acide chlorhydrique faible, il en a pu extraire une matière albuminoïde qui est devenue le premier représentant du groupe d'histone. La question est seulement de savoir jusqu'à quel point cette constatation a démontré l'exactitude des présomptions inspirées par les recherches antérieures.

Il est évident que la matière isolée ne devait pas nécessairement provenir du noyau. Elle pouvait dériver aussi bien du stroma proprement dit, qui représente le cytoplasma dans l'espèce, ou des matières *métaplastiques*, c'est-à-dire de celles qui sont déposées dans la cellule provisoirement pour sa nutrition, et qui n'ont pas eu encore le temps de subir une métamorphose complète[1]. La matière isolée pouvait enfin provenir de toutes ces sources en même temps, et présenter un mélange hétéroclite de différents albuminoïdes n'ayant de commun que les conditions de leur solubilisation.

Comme nous n'avons aucun moyen — et l'aurons-nous seulement un jour ? — de faire le partage entre ces différentes parties constituantes de la cellule, toutes les dissertations sur la localisation histochimique d'un albuminoïde isolé d'une cellule sont vouées à rester complètement hypothétiques[2].

Plus intéressantes seraient pour nous les preuves de la *basicité* du corps ou des corps extraits des cellules par l'acide chlorhydrique qui semble être admise généralement, à l'heure actuelle, comme une vérité intangible. Ce sont elles que nous

1. La quantité de ces dernières substances dans une cellule n'est pas négligeable, comme on peut en juger d'après la diminution du poids des organes pendant l'inanition prolongée d'un animal, diminution qui peut aller pour quelques-uns d'entre eux jusqu'à 50 de leur poids initial.

2. M. Saint-Hilaire (*Z. f. physiol. Ch.*, t. XXVI, p. 102) a essayé de prouver la localisation de l'histone dans le noyau cellulaire par une réaction microchimique. Les coupes, après fixation dans l'un des réactifs suivants : alcool, sublimé, acide acétique, sulfate d'ammonium, etc., furent plongées successivement dans une solution de sulfate de cuivre à 0,3 0/0, de carbonate de soude ou de soude caustique à 0,2 0/0 et, enfin, dans une solution de ferrocyanure de potassium. On observe une coloration rouge du réseau chromatique que l'auteur attribue à l'histone. Mais est-il possible de savoir exactement quelle est la matière qui se colore dans ces conditions ? D'après M. Kossel, la réaction ne serait qu'une modification de celle de biuret. S'il en était ainsi, on devrait constater une coloration diffuse de toute la cellule surtout après fixation avec l'alcool ou le sublimé, vu l'existence des matières albuminoïdes dans le suc qui imbibe les tissus. La réaction semble générale à tous les tissus. Or, d'après les recherches de M. Bang (*l. c.*, p. 471), il est impossible d'isoler des albuminoïdes avec les propriétés de l'histone des organes tels que le foie, les reins, le pancréas et les testicules.

allons chercher dans l'étude des réactions de l'histone des globules rouges d'oie, telles que les a décrites M. Kossel.

L'extrait acide des stromas fut précipité avec du sel marin, le précipité fut filtré, lavé à l'acide chlorhydrique salé, délayé dans l'eau et soumis à la dialyse. Il en résulta une solution *neutre* de l'histone. Cette solution précipitait comme les globulines sous l'influence du sulfate de magnésie et d'ammonium, mais s'en distinguait par la faculté de précipiter sous l'influence du chlorure de sodium et d'ammonium. Elle se rapprochait des albumoses par la réaction avec l'acide nitrique, dont il a été parlé plus haut, et par la non coagulabilité à la température d'ébullition. Elle précipitait aussi sous l'influence de l'eau de chaux, de la soude (soluble dans un excès). Mais ce qui frappait surtout, c'est que quelques gouttes d'ammoniaque, ajoutées à la solution neutre d'histone, y provoquaient un précipité volumineux « complètement insoluble et montrant toutes les propriétés d'un corps coagulé ».

La phrase citée a dépassé évidemment la pensée de l'auteur, puisque le précipité ammoniacal de l'histone est soluble dans la soude et dans l'acide chlorhydrique à froid. Des écrits ultérieurs il résulte que l'insolubilité n'existait que vis-à-vis d'un excès d'ammoniaque.

De toutes ces réactions, qui sont générales à toutes les albuminoïdes étudiés par nous dans ce travail, et qui n'autoriseraient pas aujourd'hui la séparation du corps isolé des globules rouges d'oie dans un groupe à part, deux seulement pouvaient être interprétées — et elles l'étaient effectivement — comme preuves de la basicité de l'histone. Ce sont la neutralité de la solution de cet albuminoïde, malgré la présence de l'acide chlorhydrique, et la réaction avec l'ammoniaque, considérée par M. Kossel comme spécifique en quelque sorte pour l'histone.

Or, après ce qui a été dit sur la rétention des matières minérales non dissociées par les colloïdes, le doute ne nous semble plus permis sur la nature du phénomène qui se passe au sein de la solution entre l'acide et l'histone. Les molécules de l'acide ne sont pas combinées chimiquement aux micelles, mais leur adhèrent seulement, comme dans les expériences citées déjà de MM. Liebermann et Bugarsky, avec le blanc d'œuf. L'insensibilité du papier de tournesol est dans ce cas analogue à celle du

nitrate d'argent pour l'acide chlorhydrique dans les solutions des colloïdes minéraux.

Quant à la réaction avec l'ammoniaque, son caractère spécifique et son intérêt ne peuvent pas résider dans la double décomposition entre l'ammoniaque et le chlorhydrate hypothétique de l'histone, et dans la précipitation qui en résulterait, — ce phénomène a lieu aussi avec la soude et l'eau de chaux, — mais dans la question de savoir pourquoi la liqueur ammoniacale est incapable de dissoudre le précipité formé, tandis que la soude y arrive facilement.

Le phénomène s'explique sans peine, comme on se rappelle, par la différence dans le degré de dissociation électrolytique de ces deux bases et n'a, par conséquent, aucun rapport avec la nature basique de l'histone.

Le sel qui se forme par neutralisation de l'acide avec l'ammoniaque y joue un rôle de premier ordre, comme l'ont montré M. Schulz et M. Bong.

C'est un cas de solubilisation étudié longuement et à rebours, sous forme de précipitation, dans le chapitre VIII de ce travail. On y trouve, dans les tableaux XI-XIII, toutes les gradations successives entre l'insolubilité du précipité dans l'ammoniaque en présence de tous les sels ammoniacaux, même du carbonate (Picea excelsa), insolubilité en présence du chlorure et du bromure et solubilité en présence du nitrate d'ammonium (Cucurbita Pepo), et solubilité complète en présence de tous les sels (Lupinus albus et luteus, blanc d'œuf). Ces différences ne se rattachent qu'à la grosseur et l'élasticité micellaires qui ne sont pas les mêmes chez les différents albuminoïdes. A la température d'ébullition, grâce à l'augmentation de la grosseur micellaire sous l'influence de la chaleur, tous les albuminoïdes, étudiés par nous, étaient insolubles dans l'ammoniaque et devenaient, par conséquent, semblables à l'histone. Ils ne pouvaient pas, cependant, acquérir des propriétés basiques tout d'un coup sous l'influence de la chaleur [1].

1. Mais même dans le cas des albuminoïdes de Picea excelsa qui donnent la réaction avec l'ammoniaque d'une façon la plus générale, il serait inexact de parler de l'insolubilité absolue du précipité dans l'excès de l'ammoniaque, puisque avec l'augmentation de la concentration de cette base, augmente aussi la concentration du sel nécessaire à la précipitation, comme on le reconnaît aisément au tableau XIV. M. Bong a fait la même constatation, sans se préoccuper du reste du mécanisme intime du phénomène, pour la globine, l'histone des

On voit donc que non seulement il est impossible de démontrer l'origine nucléaire de l'histone, mais que rien aussi dans les réactions de ce corps ne peut faire penser à sa nature basique.

Alors comment soutenir plus longtemps la conception de la nucléohistone, de cette combinaison d'un albuminoïde basique de l'histone avec la leuconucléine, nucléoprotéide acide que M. Lilienfeld[1] a cru voir dans le précipité, obtenu avec de l'acide acétique dans les extraits aqueux des lymphocytes des glandes lymphatiques et du thymus de veau.

D'après les recherches de M. Lilienfeld, 100 grammes de matière sèche des lymphocytes contiendraient en nucléohistone $77^{gr},45$: en d'autres albumoïdes[2] $1^{gr},76$: en lécithine, cholestérine, graisses, glycogène, inosite, etc., le restant de $20^{gr},79$.

Ces nombres qui font supposer que l'être extrêmement compliqué, à fonctions variées et délicates, qu'est le leucocyte est formé presque entièrement par une seule combinaison chimique azotée, où doivent naturellement entrer, outre les fragments sans nombre du protoplasma proprement dit, de ce qui est l'instrument de la vie et la cause de la spécificité de la cellule, encore les matières métaplastiques ou tout au moins les albuminoïdes de la lymphe qui imbibe les lymphocytes, ces nombres, dis-je, ne rappellent-ils pas le léponucléate de lépoalbumine imaginaire dont se composerait chimiquement le lapin dans notre expérience hypothétique de plus haut?

Il n'est donc pas étonnant que les auteurs qui ont repris tout récemment l'étude chimique du thymus soient arrivés à des constatations variables, suivant la méthode appliquée, mais toujours différentes de celles de M. Lilienfeld.

M. Neumann[3] a trouvé que « l'acide nucléique », isolé du thymus par le procédé indiqué par lui précédemment en collaboration avec M. Kossel[4], présente un mélange de trois

globules d'oie et du thymus. M. Lawrow (*Z. f. physiol. Ch.*, t. XXVIII, p. 388) n'a pas réussi à précipiter l'histone du thymus par un excès d'ammoniaque même en recourant à l'alcool. Ajoutons encore que M. Bang a pu obtenir la réaction « spécifique » de l'histone aussi avec l'ovovitelline et l'acidalbumine de la fibrine.

1. *Z. f. physiol. Ch.*, t. XVIII, p. 473; t. XX, p. 89.

2. Parmi ces albuminoïdes, un nucléoprotéide contenant 0,115 0/0 de phosphore. La leuconucléine en contiendrait jusqu'à 5 0/0.

3. *Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin in Arch. f. Physiologie*, 1898, p. 347.

4. *Ber. d. D. Chem. Ges.*, t. XXVII, p. 2215, 1894.

corps qu'il appelle acides nucléique α, β, et nucléothymique.

M. Fleroff[1] a isolé du thymus encore une « parahistone », dont il n'est facile de saisir ni la parenté avec l'histone, ni les différences avec d'autres albuminoïdes, mais qui en tout cas ne trouve pas de place dans le tableau analytique de M. Lilienfeld.

M. Malengreau[2] a trouvé que l'extrait aqueux du thymus est composé de parties égales de *deux* nucléohistones, dont l'une contient 0,5 0/0 de phosphore, l'autre 4.5 0/0. On peut les séparer facilement en fractionnant l'extrait avec du sulfate d'ammonium. Les histones qu'on en isole ne semblaient pas identiques.

M. Kiriskamp[3] chercha à fractionner l'extrait du thymus à l'aide du chlorure de calcium. Il y trouva sur cent parties de matières protéiques de l'extrait :

Nucléohistone (sous forme de sel calcique) ...	69,4	avec 3,8 0/0 de phosphore.
Nucléoprotéide.....	18,7	— 0,95 0/0 —
Albuminoïdes ordinaires.....	11,9	

Enfin, M. Ivar Bong[4], qui eut le premier le sentiment du caractère artificiel de ces combinaisons, est arrivé à des résultats encore plus curieux.

Il épuisa le thymus convenablement préparé avec une solution physiologique de sel marin qui ne devait rien dissoudre, d'après M. Lilienfeld, et qui amena cependant des matières albuminoïdes de toute sorte. De l'extrait aqueux du thymus ainsi traité, M. Bong a pu isoler, par l'action combinée du chlorure de sodium concentré et faible et de l'alcool, des corps rappelant par leurs propriétés l'histone, des albuminoïdes solubles dans le chlorure de sodium saturé et dans l'alcool, des matières nucléiques absolument libres d'albuminoïde, mais pas de trace de leuconucléine, qui passe, cependant, pour une combinaison de l'acide thymonucléique et d'un albuminoïde difficile à désagréger par des réactifs neutres.

M. Yvar Bong conclut évidemment avec infiniment de raison que la nucléohistone n'existe pas. On aimerait toutefois à voir dans le travailde cet auteur l'idée nettement exprimée

1. *Z. f. physiol. Ch.*, t. XXVIII, p. 306, 1899.
2. *La Cellule*, t. XVII, p. 393.
3. *Z. f. physiol. Ch.*, t. XXXII, p. 145, 1901.
4. *Ibidem*, t. XXX, p. 508, 1900. Voir aussi la réponse de M. Kossel à cet article, p. 520, et les explications de M. Bong, t. XXXI, p. 407.

de l'impossibilité biologique de la conception analysée par nous et un peu plus de scepticisme sur le caractère défini des différentes préparations isolées par lui au cours de son étude.

Il est à peine nécessaire d'ajouter que tout ce qui vient d'être dit à propos de la nucléohistone du thymus se rapporte aussi bien aux nucléoprotéides isolés d'autres organes ou des organismes monocellulaires[1].

Adressons-nous maintenant à l'examen des travaux qui ont inspiré l'idée du rapport causal entre la richesse en produits de dédoublement basiques et les réactions physiques de l'histone, spécialement celle que l'on observe avec l'ammoniaque.

Nous empruntons au discours prononcé par M. Kossel à la Société de biologie de Berlin en 1894 la description de l'observation qui a servi de point de départ à cette deuxième partie de la théorie de l'histone.

« J'ai réussi à préparer artificiellement, a dit cet auteur, aux dépens de deux matières constitutives des tissus d'origine animale, une substance qui ne se laisse pas distinguer de l'histone. Ajoute-t-on une solution de protamine à une solution d'albumose (ou d'albumine), le liquide reste clair. Si l'on y introduit alors un peu d'ammoniaque, un précipité apparaît qui possède toutes les propriétés de l'histone[2]. »

Aucun autre détail expérimental. En guise de commentaire les deux lignes suivantes : « La protamine est une base ; elle ne peut se combiner avec l'albumine qu'en solution alcaline, et il en résulte une manière protéique aux propriétés basiques, l'histone. »

En publiant deux ans plus tard les résultats de ses recherches sur les produits de dédoublement de la salmine et de la sturine sous l'influence de l'acide sulfurique à 33 0/0 en volume à la température d'ébullition, qui ont fait ressortir l'énorme quantité des matières azotées, précipitables par l'acide phosphorotungstique, qui prennent naissance pendant cette opération (96 0/0 de l'azote total), M. Kossel ajoute, en rappelant la

1. Nischimura, *Arch. f. Hygiene*, t. XVIII, p. 318 ; Goleotti, *Z. f. physiol. Ch* t. XXV, etc.

2. *Deutsche Med. Wochenschrift*, 1894, p. 146. L'expérience est décrite presque dans les mêmes termes par M. Kossel en 1899 dans un article intitulé : « Les protamines et les corps albuminoïdes », publié dans la *Revue générale des sciences*, p. 380.

« synthèse » de l'histone effectuée *in vitro* : « Par une telle adjonction de la protamine à l'albumine doivent naturellement prendre naissance des corps qui fourniraient à l'hydrolyse plus d'arginine ou d'autres bases en général. »

Les recherches quantitatives sur les produits de dédoublement basiques de différents albuminoïdes furent continuées. M. Kossel a trouvé que la teneur en azote de la fraction qui devait contenir l'arginine et l'histidine correspondait au chiffre de 12 à 18 0/0 de l'azote total pour la caséine et l'albumine d'œuf, de 20 0/0 à peu près pour la deutéroalbumose, de 4 0 0 seulement pour l'élastine. Une place à part appartenait à l'histone qui en contenait jusqu'à 30 0/0.

« Les résultats quantitatifs confirment donc, conclut M. Kossel, la présomption que j'ai exprimée en me basant sur d'autres expériences que les histones sont des matières protéiques qui apparaissent par adjonction d'une quantité plus grande de protamine à une albuminoïde ordinaire[1] ». De là cette remarque prophétique sur les propriétés physiques des albuminoïdes de Picea excelsa[2], qu'on a vu si brillamment confirmée par nos recherches. On comprend l'importance de ces considérations pour la question qui nous intéresse. Si elles étaient réellement à l'abri de toute critique, nous aurions la preuve de la relation entre la grosseur et l'élasticité micellaire d'un albuminoïde et sa richesse en produits basiques de dédoublement.

Malheureusement, aux faits cités par M. Kossel, nous sommes en mesure d'opposer d'autres moins nombreux qui prouvent que, malgré la haute teneur en produits basiques, les propriétés physiques d'un albuminoïde ne rappelle en rien celles de l'histone.

D'après les déterminations de MM. Schulze et Rongger[3], la fraction basique des produits de dédoublement des albuminoïdes du sapin rouge contient de 29 à 32.8 0/0 de l'azote total. La gélatine en contient 35.83 0/0 d'après les recherches de M. Hausmann[4], l'hétéroalbumose, préparée d'après la méthode de M. Pick[5],

1. *Deutsche Med. Wochenschrift*, 1898, n° 37.

2. Ces albuminoïdes n'ont, d'ailleurs, rien de commun avec le noyau cellulaire puisqu'ils appartiennent en plus grande partie, il ne peut pas y avoir de doute là-dessus, au grain d'oleurone.

3. *Z. f. physiol. Ch.*, t. XXIV, p. 276.

4. *Ibidem*, t. XXIX, p. 136, 1900.

5. *Ibidem*, t. XXVIII, p. 258, 1899.

38,93 0/0, et cependant ces corps sont loin de ressembler à l'histone. La globine, obtenue par décomposition de l'hémoglobine du cheval, et donnant la réaction avec de l'ammoniaque, ne contiendrait que 29,37 0/0 de l'azote total. Les albuminoïdes du lupin blanc ne donnent pas cette dernière réaction à froid, comme le blanc d'œuf, mais tandis que celui-ci présente 21,33 0/0 de son azote sous forme de produits basiques, d'après Haussmann, les premiers en contiennent au moins 36,9 0/0 d'après mes recherches personnelles, comme on le voit des nombres suivants.

Sur 12gr,9321 d'azote total, on a trouvé 4gr,7722 d'azote dans la fraction basique[1] qui contenait 19gr,8 de matière organique. J'en ai pu isoler 4gr,3 de nitrate d'arginine et 1gr,3 de picrate de lysine, transformé en chloroplatinate et identifié sous cette forme. La cristallisation de la fraction d'histidine ne m'a pas réussi.

Il ressort en outre de ces nombres que les bases hexoniques ne forment qu'une partie assez restreinte des produits basiques de dédoublement. Des rapports analogues furent constatés par moi aussi pour d'autres albuminoïdes. Les recherches qui y ont trait seront publiées plus tard.

La confirmation des prévisions de M. Kossel, basées sur la théorie de l'histone, était donc tout à fait accidentelle, ce qui doit d'autant moins étonner que la réaction avec l'ammoniaque et la grosseur micellaire dont elle dépend est très répandue parmi les albuminoïdes connus ainsi que la richesse de ces matières en produits basiques de dédoublement.

D'ailleurs, le fait fondamental de cette deuxième partie de la théorie de l'histone, la précipitation d'une solution d'albumine par la protamine en milieu ammoniacal, est un phénomène d'ordre purement physique. De ce qu'un précipité n'apparaît qu'en présence de l'ammoniaque, il n'est pas permis de conclure à la synthèse artificielle d'un corps « qui possède toutes les propriétés de l'histone. » Une solution faiblement acide des albuminoïdes du lupin blanc ne précipite pas lorsqu'on y ajoute une solution aqueuse de dextrine. Si la concentration de ce dernier corps

1. Le dosage de l'azote basique fut fait dans une portion aliquote du précipité phosphorotungstique dissous dans l'alcool à 90° à chaud, filtré et rempli à un litre. Cette manière de procéder permet de se débarrasser des matières mélanoïdiques et de la plus grande partie de l'ammoniaque, précipitées par l'acide phosphorotungstique avec les bases organiques.

est assez grande, le précipité sera obtenu lorsqu'on aura ramené le mélange à une réaction légèrement alcaline. S'ensuit-il que la dextrine est un corps basique, et qu'en se combinant chimiquement avec les albuminoïdes du lupin blanc elle donne naissance à une histone?

Si la réaction avec la protamine est réellement analogue à la précipitation des albuminoïdes par les albumoses, comme l'admet M. Kossel à propos du travail de M. Kutscher, il est plus que certain qu'en modifiant les concentrations des corps qu'on fait réagir dans l'expérience examinée, on arrivera à obtenir un précipité avec la protamine même en solution acide.

On se demandera peut-être, à la suite de ces remarques, s'il ne serait pas avantageux, tout en éliminant de la conception de l'histone les considérations histochimiques et l'idée de la basicité des corps en question, de conserver ce nom pour désigner un groupe d'albuminoïdes riches en produits basiques de décomposition. L'utilité de la création de ce groupe me semble tout à fait problématique. Laisse-t-on au terme histone une signification relative, tous les albuminoïdes se trouveront réunis dans le même groupe, car du moment que l'on considère les albuminoïdes du sapin rouge avec 32,8 0/0 d'azote basique comme histone par rapport au blanc d'œuf qui n'en contient que 21,33 0/0, on devra déclarer également celui-ci histone par rapport à l'élastine qui donne très peu de bases à l'hydrolyse et ainsi de suite. Si l'on se décide, d'autre part, de fixer, d'une façon forcément arbitraire, un minimum d'azote basique au-dessous duquel une matière protéique ne serait plus classée parmi les histones, tous les albuminoïdes se trouveront subdivisés en deux groupes, ce qui n'apportera pas plus de lumière dans la question complexe de classification de ces corps qu'il n'en existe actuellement.

Ne serait-il pas plus sage de faire disparaître complètement le terme « histone », auquel se rattachent des généralisations injustifiées et des interprétations inexactes?

CONCLUSIONS

Nous sommes au bout de la tâche que nous nous sommes imposée.

Après avoir montré que les colloïdes se caractérisent surtout

par la résistance que leurs unités physiques opposent à la dissociation par l'eau, il nous a été possible, par une discussion raisonnée des nombres obtenus à la précipitation à l'aide des sels des matières albuminoïdes, placées dans des conditions définies, de saisir les propriétés inhérentes aux micelles, de déceler les facteurs capables de les mettre en jeu et de reconstituer le mécanisme intime des modifications d'état des colloïdes en général et des albuminoïdes en particulier.

Les notions acquises, appliquées à la discussion de différentes conceptions en cours dans la chimie des albuminoïdes, ont fait ressortir la nature artificielle et l'inexactitude de la plupart d'entre elles.

Créés en vue d'établir quelques distinctions dans le vaste domaine des matières protéiques, ces conceptions ont été basées soit sur des caractères ne dépendant que des variations du milieu dans lequel se trouvaient les matières étudiées, soit sur les propriétés les plus générales des colloïdes, qui ont été déclarées cependant spécifiques, parce qu'elles étaient découvertes accidentellement dans l'étude d'une matière d'une origine déterminée.

Dans ce travail, nous nous sommes efforcé de démontrer que les différents albuminoïdes se distinguent uniquement par la grosseur et l'élasticité de leurs micelles, et que c'est par le caractère électif de leur affinité adhésive que peuvent être différenciés les divers groupes de colloïdes. Les propriétés physiques de la micelle suffisent complètement pour expliquer et coordonner presque la totalité des phénomènes observés chez les albuminoïdes, et dont une grande partie a pu paraître contradictoire au point de vue des notions répandues.

En remontant aux propriétés physiques de la micelle pour caractériser les colloïdes, nous ne faisons en somme qu'étendre à ces corps ce que le chimiste fait depuis longtemps pour identifier les cristalloïdes. Il étudie, comme on sait, la forme cristalline, les constantes physiques telles que la solubilité, la température de fusion, etc., propriétés en relation avec la structure micellaire de ce corps. Comme les albuminoïdes sont amorphes et ne fondent pas dans la plupart des cas ; comme leur solubilisation présente des particularités qui même après avoir été précisées, ne se prêtent pas à la distinction des individualités

différentes, il est naturel de s'adresser aux autres propriétés micellaires pour chercher les éléments distinctifs.

Certes, nos mesures de la grosseur et de l'élasticité micellaires sont rudimentaires par comparaison à la perfection des déterminations cristallographiques et de celles des constantes physiques. Mais le but de ce travail n'était que de montrer en principe la possibilité d'utiliser ces propriétés de la micelle pour l'identification des colloïdes. C'est aux travaux ultérieurs qu'incombera le soin de perfectionner la méthode, de créer des unités de mesure appropriées, et de trouver des facteurs où les valeurs exprimant les propriétés fondamentales de la micelle seraient moins masquées par des influences secondaires que dans les concentrations précipitantes et dans les quotients bautilisés par nous pournos études comparées.

Un autre point qui mériterait d'attirer l'attention dans nos recherches. c'est l'importance de l'affinité adhésive des micelles dans les phénomènes qui se passent en présence des colloïdes. Nous avons vu que cette affinité se montre nettement élective comme l'affinité chimique. quoique bien différente d'elle.

Qui sait, si en approfondissant les études sur cette question, on ne tombera pas un jour sur un principe nouveau qui donnerait à la chimie biologique un élan pareil à celui qui fut communiqué à la chimie organique par la théorie de la structure moléculaire.

Il n'était pas dit que la complication de la matière organique se fît uniquement d'après les lois connues actuellement des chimistes, encore moins d'après l'image d'un sel minéral, comme le semblent admettre les adeptes des idées de M. Miescher. Rien dans les résultats obtenus jusqu'ici par la chimie ne fait espérer la possibilité d'élucider l'*organisation* de la matière *vivante*. qui a apparu cependant sur notre planète sans participation des forces surnaturelles, par l'évolution normale des propriétés inhérentes à la matière inerte.

Le protoplasma étant constitué principalement par des matières colloïdes, dont les micelles ne se dissocient pas sans intervention d'une réaction chimique, on se voit enclin de penser que c'est justement à l'affinité élective des micelles qu'appartiendrait le rôle le plus important dans la structure de la cellule.

La chimie cellulaire ne peut pas être, croyons-nous, purement *moléculaire*, elle doit être en grande partie une chimie *micellaire*.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE AOUT 1901 N°8

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA TYROSINASE

PAR C. GESSARD

(Travail de l'Institut Pasteur de Lille.)

La tyrosinase[1], ferment oxydant de la tyrosine, sollicite l'attention à plus d'un titre. C'est d'abord l'intérêt qui s'attache à cette classe nouvelle de diastases, les oxydases, dont elle est, chronologiquement, le second représentant. D'autre part, son action porte sur un corps cristallisé, de composition bien connue et relativement simple, qui doit favoriser l'étude des transformations qu'elle imprime; et elle se révèle par une production de couleur, d'observation facile d'abord et sans le secours d'aucun autre réactif. C'est cette couleur que j'ai particulièrement étudiée, en elle-même, et en tant que traduction à nos yeux de l'action de la diastase. Disons tout de suite dans quelles bornes on peut en tirer profit à ce dernier point de vue.

Si la coloration, partant l'action diastasique dont elle est le témoin, se perçoit avec la plus grande netteté dès ses débuts, il est, au contraire, extrêmement difficile, comme nous verrons, d'en mesurer les progrès et d'en fixer le terme précis La tyrosinase occupe ainsi une place à part, à égale distance des diastases coagulantes dont l'action, aussi difficile à suivre dans sa marche, ne se mesure bien qu'à son terme seulement, et des diastases hydrolysantes, dont toutes les phases de l'action

1. E. BOURQUELOT et G. BERTRAND, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1895, p. 582; G. BERTRAND, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXXII, p. 1215.

peuvent se mesurer avec précision. Néanmoins, à cause de la facilité d'observation des phénomènes de coloration, la tyrosinase me paraît être, au regard des diastases, susceptible des applications que les microbes chromogènes ont reçues pour l'étude et l'illustration des propriétés microbiennes.

I

RÉACTIONS CHROMOGÈNES

La tyrosinase se trouve dans un grand nombre de champignons[1]. Pour l'en extraire, on broie ces champignons avec de l'eau chloroformée ou de la glycérine[2]. La diastase se conserve mieux en solution glycérinée. C'est cette dernière que j'ai employée, après m'être assuré que la nature du dissolvant était sans influence sur les résultats observés.

L'addition de tyrosinase à une solution de tyrosine, en même temps qu'elle détermine une absorption d'oxygène, fonction de l'oxydase, fait donc apparaître une couleur dans le mélange. C'est une coloration rose d'abord, qui passe au rouge jaune et en se foncant devient rouge acajou, rouge grenat, toujours plus marquée à la partie supérieure du liquide au contact de l'air, d'où elle se répand dans la profondeur. C'est par ces changements de teinte qu'on peut apprécier le progrès de l'action diastasique concomitante : on sent de quelle délicatesse en serait la notation exacte. J'ai montré[3] que ce sont les seules couleurs imputables à la diastase elle-même. Je n'obtiens qu'elles, quand j'ajoute à 2 c. c. d'une solution de tyrosine à 0,05 pour 100 (c'est le titre et la proportion de solution que j'ai adoptés pour toutes mes expériences) une goutte seulement de la solution glycérinée que j'ai préparée et qui a servi aussi à toutes mes recherches. J'ai pris pour étalon le mélange, dans ces proportions, de tyrosine et de tyrosinase, et j'ai fixé à 24 heures le délai pour observer la succession des teintes susdites, et considérer comme atteint le terme de l'action diastasique, terme forcément arbitraire entre des apparences si changeantes. Car, à une observa-

1. E. Bourquelot. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1896, p. 811.
2. E. Bourquelot, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1896, p. 893; 1897, p. 454; V. Harlay. *These de doctorat de l'Ec. supér. de Pharmacie de Paris*, 1900, p. 127
3. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXXX, p. 1327.

tion prolongée, et c'est par jours dès lors qu'il faut compter, on voit la couleur rouge subir un brunissement prononcé, toutefois sans jamais passer au noir, même en vase plat dans un large contact avec l'air. Le terme de ses transformations est un brun havane et résulte d'une lente oxydation, qui peut s'accompagner de la formation de pellicules minces, comme en donne l'oxydation de la matière colorante du vin. Mais la diastase n'a plus part à cette oxydation. On peut, en effet, l'obtenir instantanément par l'ébullition : la liqueur rouge se décolore plus ou moins et, après refroidissement, offre la teinte brune définitive.

En faisant agir une plus grande quantité de diastase (soit dix gouttes de *ma* solution glycérinée), on observe dans le même ordre la succession des rouges, seulement tout se passe avec plus de rapidité. Mais tout ne se borne pas là, et, dans un temps variable qui peut être assez long, succède au rouge une couleur noire qui rend le liquide comme de l'encre. Ce noir se rassemble enfin en un précipité amorphe et la liqueur surnageante est entièrement décolorée. Ce nouveau phénomène, qui constitue une phase distincte dans la suite des colorations, comme l'avaient bien vu MM. Bertrand et Bourquelot[1], dépend aussi d'un autre agent que la diastase. On peut le provoquer aussi bien avec dix gouttes qui ne comprennent qu'une goutte de solution diastasique intacte, les neuf autres ayant subi l'action de la température qui détruit la diastase. Il ne reste plus dans ces neuf gouttes que les éléments minéraux qui se trouvent associés à la diastase dans le milieu naturel où elle est empruntée, et qui ont passé avec elle dans la liqueur glycérinée. Dès lors, on doit pouvoir obtenir les mêmes effets de noircissement et de précipitation, en faisant un apport artificiel des éléments nécessaires qui font défaut dans notre première expérience, où une goutte seulement de la solution diastasique entre en jeu. J'ai vu qu'il en était bien ainsi, et que la nature du sel que j'ajoutais était indifférente au succès. C'est pourquoi je n'essaierai pas de déterminer la nature de l'élément minéral, simple ou complexe, qui agit dans le produit naturel.

Il importe aussi peu pour le but proposé, qui est la formation et la précipitation du noir, que le sel soit ajouté au début en même temps que la goutte de diastase, ou quand la cou-

1. *Loco citato.*

leur rouge est déjà atteinte et ne ferait plus que brunir sans cette addition. Mais il va de soi que le sel, surtout s'il est mis au début, ne doit pas avoir une réaction acide ou alcaline telle qu'elle nuirait d'abord à l'action de la diastase. Sous cette réserve, qui fait toujours donner la préférence aux sels neutres alcalins, alcalino-terreux et magnésiens, tous réussissent, à quelque acide que les bases soient combinées : azotates, phosphates, sulfates, chlorures. Mais les sels alcalino-terreux, dont il faut rapprocher les sels de magnésie, gardent la supériorité qu'ils montrent déjà dans les phénomènes de coagulation.

Par exemple, il faut dix fois moins de sulfate de magnésie que de chlorure de sodium, un milligramme du premier contre un centigramme du second, pour précipiter la couleur du mélange-étalon, et le précipité se fait plus rapidement, est noir, tassé, adhérent au verre. Il est moins cohérent et garde de la couleur rouge du liquide avec le chlorure de sodium. Des différences de même sens s'observent dans l'aspect des précipités produits par le chlorure de sodium et par un sel de chaux dans la paracaséine d'Hammarsten[1]. Il s'agit de coagulation dans ce dernier cas.

C'est aussi bien à une coagulation qu'il faut rapporter le phénomène que produisent les sels, associés naturellement ou artificiellement ajoutés à l'action diastasique de la tyrosinase. Leur effet univoque, sous leur différence de composition, montre bien qu'il ne s'agit pas là d'une action chimique, qu'ils n'entrent pas en combinaison pour transformer la matière colorante rouge. Ils changent seulement la composition du milieu qui la maintenait en solution, et par suite les conditions d'adhésion de cette matière au liquide.

Maintes fois, en analyse, on a recours à une intervention de ce genre pour provoquer ou favoriser la formation d'un précipité, et une action chimique ne peut pas davantage y être invoquée : le chlorhydrate d'ammoniaque, entre autres sels qui nous donnent ici le passage du rouge au noir, sert aussi à hâter le précipité noir de sulfure de fer, aux dépens de la coloration verte qui est le premier et, pendant quelque temps, l'unique effet de l'addition de sulfhydrate d'ammoniaque dans les dissolutions très étendues de protosel.

1. A. Briot, *Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences*. Paris, 1900.

Ce qui exclut encore mieux toute interprétation de l'ordre chimique, c'est qu'un corps solide quelconque peut aussi dépouiller complètement la liqueur rouge de sa couleur, en contractant avec celle-ci une adhésion plus stable. Il suffit d'agiter la liqueur avec une poudre inerte, craie ou phosphate de chaux, carbonate de magnésie, talc ou amidon, etc., pour obtenir le dépôt du précipité noir sur ces corps. Cette faculté d'adhésion aux solides m'a même permis de réaliser une véritable teinture. Dans le mélange de tyrosine et de tyrosinase, aux doses qui n'aboutissent pas spontanément à la formation du précipité, et exposé dans un vase plat au large contact de l'air, j'ai fait plonger une floche de soie. Dans l'espace de 24 heures, la liqueur s'est dépouillée de la couleur rouge qui avait d'abord pris naissance, et la soie s'est teinte en noir qui résiste assez bien à l'action de l'eau bouillante.

Qu'on ait eu recours à un excès de tyrosinase ou à l'addition d'un sel à la dose convenable, la production du noir définitif peut être accélérée par la chaleur. L'ébullition décolore instantanément la liqueur rouge, avec formation et dépôt du précipité noir par le refroidissement, preuve nouvelle que la diastase elle-même n'entre pour rien dans cette dernière phase de la réaction d'une solution de tyrosinase sur la tyrosine.

L'action de l'élément minéral, qui est alors seul en jeu, est en tout cas subordonnée à son rapport de proportion avec la diastase, comme il paraît assez par les expériences précitées. Quand ce rapport s'élève, le noircissement est notablement accéléré. Si j'emploie, pour dissoudre la tyrosine, l'eau d'alimentation de la ville de Lille, abondante en sels calcaires, toutes choses égales d'ailleurs et la quantité de tyrosinase restant bornée à une seule goutte pour 2 c. c. de solution, comme dans notre première expérience, la couleur, qui persisterait à ces doses dans le mélange-étalon fait à l'eau distillée, n'est plus qu'éphémère, et très rapidement survient le noir, accompagné de précipité. On supprime jusqu'à cette courte apparition du rouge, et la couleur noire apparaît d'emblée, quand on emploie une solution de tyrosine dans le sirop simple des pharmacies, sirop préparé avec cette même eau de la ville et où le sucre retient les sels calcaires en solution, si même il n'en apporte en surplus. Enfin le même effet de noir d'emblée s'obtient en saturant la solution de tyrosine de

sulfate de magnésie, lequel sel, à proportions égales, montre, pour cet objet, une supériorité marquée sur les alcalino-terreux.

Inversement, on peut ralentir la production du précipité, jusqu'à en ajourner, pour ainsi dire indéfiniment, la complète réalisation; on y arrive avec les différents sels alcalino-terreux et magnésiens employés à des doses variables comprises entre celle qui donne du rouge grenat et celle qui produit le noir d'encre et la décoloration par précipitation totale. Des nuances intermédiaires, qui autrement passent inaperçues, peuvent être facilement saisies avec des doses graduées de ces sels. Ce sont des violets et des bleus plus ou moins sombres, puis des gris qui participent alternativement de l'une et de l'autre couleur, et qui en retiennent ce reflet indécis bien désigné par le terme d'ardoisé. Mais nous pouvons aussi obtenir ces teintes de passage, notamment le violet, dans les conditions que l'on peut dire normales, c'est-à-dire sans ajouter de sel étranger au milieu.

Pour cela, préparons une série de dilutions de la liqueur diastasique, en mettant une goutte de celle-ci successivement dans un nombre croissant de gouttes d'eau distillée : 6, 12, 18, et ainsi de suite jusqu'à 60. De chaque dilution introduisons une goutte dans un tube contenant la dose habituelle de solution de tyrosine, et affecté d'un numéro correspondant au chiffre de la dilution; un tube témoin reçoit une goutte de diastase pure. Nous obtenons une échelle de colorations, où l'affaiblissement de teinte est proportionnel à l'élévation du numéro du tube. Mais, à partir d'un certain degré qui s'est trouvé à deux reprises correspondre au tube 36, la teinte affaiblie ne rappelle plus la couleur du témoin et n'a plus rien du grenat plus ou moins clair qui représentait l'atténuation de cette dernière dans les tubes précédents : du violet clair ou lilas y a succédé. Ce violet, d'ailleurs, aussi bien que le grenat, est l'aboutissant du rose qui est la teinte de début commune à tous les tubes. Il faut seulement lui accorder un plus long répit (qui ne dépasse pas encore 48 heures), puisqu'il s'agit là d'une phase secondaire du phénomène, de l'action post-diastasique des sels. En effet, la dilution a réduit à la fois la production de matière colorante et la quantité des sels qui la gardait inaltérée. Mais elle n'a pas conservé l'équilibre entre ces influences, et la matière colo-

rante est restée au-dessous du taux où elle se maintiendrait inaltérée dans une solution saline aussi diluée.

Est-il besoin de faire remarquer que cette expression d' « inaltérée » se tire de la seule comparaison avec la couleur du tube témoin, et ne saurait avoir d'autre référence? Car il nous est impossible d'obtenir la diastase sans sels, et, par suite, de faire le départ du rôle de ces sels, encore que nous le puissions soupçonner déjà dans la réaction-type elle-même, dans la coloration du témoin. Nous réservons donc une place à l'hypothèse où la première apparition de couleur, le rose initial même, serait sous la dépendance de ces sels, et le début du phénomène de coagulation que nous avons vu s'achever par eux. Mais c'est un point qui ne pourra être éclairci que quand on saura mieux ce qui se produit, en dehors des couleurs, dans l'absorption de l'oxygène par la tyrosine à la faveur de sa diastase. Notons dès à présent que la matière rouge coagulable passe intacte à travers le filtre Chamberland.

Ainsi la succession des couleurs du rose au rouge grenat, telle que nous l'avons d'abord décrite et réalisée par l'emploi d'une seule goutte de liqueur glycérinée, restera pour nous l'attribut et la réaction-type de la diastase, puisqu'il ne peut être actuellement question de distinguer dans ce phénomène complexe quelle part revient respectivement à la diastase elle-même et aux éléments minéraux qui l'accompagnent. C'est le type auquel nous rapporterons les déviations qu'il subit, comme nous venons de le voir, sous l'influence des sels et des proportions respectives de la diastase et des éléments minéraux. Proposons-nous maintenant, pour corroborer ces conclusions, de reproduire ces déviations avec le mélange-étalon lui-même, sans recourir cette fois à la dilution de la diastase, ni à l'apport de sel étranger, comme nous avons fait jusqu'ici. Il nous suffira de modifier le rapport des deux facteurs en cours d'action : par exemple, en suspendant l'action de la diastase à un moment donné, au cours des 24 heures que nous lui avons assignées. Il y a pour cela bien des moyens.

On peut employer la chaleur, quand la quantité de couleur produite est suffisante pour fournir un précipité visible par l'ébullition, avec la même proportion de sels qui ne donnerait, rappelons-le, que du brun havane, si on laissait l'expérience

suivre son cours. Je ne saurais indiquer de signe ni de temps pour fixer ce moment, et je ne l'ai rencontré que par tâtonnement, en chauffant à des intervalles divers une série de tubes mis en expérience en même temps. Mais l'important, c'est qu'il existe.

On peut aussi, au voisinage du même moment, supprimer, sinon cette fois la diastase, du moins ses effets, en empêchant l'arrivée de l'air qu'elle met en œuvre. Pour cela, le mélange est scellé en tube clos. On obtient, selon le degré où la réaction était parvenue, ou le précipité noir dans la liqueur décolorée, ou les colorations violette, grise ou noire de la liqueur, qui précèdent le précipité.

Dans une autre expérience, le mélange-étalon est aspiré dans un tube étroit où il occupe une grande hauteur sous peu de surface exposée à l'air. La formation du pigment rouge est ainsi réduite à une zone qui est très limitée dans la profondeur, d'où l'action de la diastase est exclue par défaut d'air, et où, par conséquent, l'action des sels va devenir prédominante. Aussi ce qui y diffuse de la couleur de la surface se rabat de noir et montre le passage au violet et au gris ardoisé.

Suivant un autre dispositif qui ne tient plus compte des proportions du mélange-étalon, on dépose au fond d'un tube une petite portion de glycérine diastasique, et on y superpose, avec précaution pour éviter le mélange, de la solution de tyrosine. Lentement la liqueur glycérinée diffuse, et la petite quantité de couleur qui peut se produire dans ces conditions limitatives de la diastase, à partir du bas et seulement à la faveur de l'air dissous dans le liquide, prend bientôt les teintes sombres déjà décrites, caractéristiques de l'intervention des sels dont l'action s'exerce intégralement.

Le même effet résultera de la concentration de la liqueur par l'évaporation, qui assure aussi à un moment donné la prédominance à l'élément salin. Quelques gouttes du mélange-étalon rougi, déposées sur une soucoupe, s'entourent bientôt d'un liséré violet, dont la largeur s'accroît à mesure que se réduit la partie liquide par l'évaporation à la périphérie. En résumé, le même phénomène se retrouve dans toutes les circonstances qui troublent le rapport de proportion des deux éléments en balance dans la solution diastasique, en affectant inégalement la durée et la quantité de leur action respective.

Voici, pour terminer, une expérience qui permet de réaliser d'un seul coup toutes ces variétés de tons dans la gamme des gris nuancés de violet et de bleu, dont les expériences qui précèdent nous ont fourni seulement des échantillons épars. Soit le mélange à dix gouttes de glycérine diastasique qui, comme nous savons, précipiterait spontanément dans l'espace de 24 heures, Dès après huit heures, devenu d'un beau rouge acajou. il est capable de précipiter à l'ébullition. A ce moment. on en introduit des nombres de gouttes croissants, successivement dans des tubes contenant 2 c. c. d'eau distillée : d'où résulte une série de dilutions graduelles du rouge acajou, lesquelles seront abandonnées à elles-mêmes jusqu'au lendemain ou bouillies incontinent. L'effet, dans les deux cas, est identique : l'action de la diastase est réduite ou annihilée. et les sels inaltérés modifient proportionnellement la couleur primitive. On a pu, d'autre part, au cours de la même expérience, prélever, à différents intervalles de temps sur cette durée de huit heures, des portions égales du mélange, et les faire bouillir. On multiplie ainsi les chances d'obtenir toutes les variétés de teintes de passage, à la réussite desquelles il est assez difficile d'assigner un déterminisme plus rigoureux.

Nous sommes maintenant familiarisés avec les divers aspects colorés qui se rencontrent, soit dans les conditions naturelles, soit dans les conditions expérimentales calquées sur les conditions naturelles. Nous pouvons étudier dès lors un cas singulier de dérogation, au moins partielle, à nos phénomènes de coloration accoutumés, que j'ai à dessein réservé jusqu'à ce moment. Quand on ajoute une goutte de solution à 1 pour 100 de sulfate ou de lactate de fer à la solution de tyrosine, la tyrosinase n'y donne plus la couleur rose ordinaire, mais un beau vert d'eau qui se développe de la même façon que le rose et sous la même cause, en gagnant de la surface à la profondeur. Ce vert se fonce ensuite et passe à une teinte bleue plus ou moins foncée, plus ou moins pure, suivie d'une précipitation en noir ou noir bleu qui laisse la liqueur décolorée. Quand la même dose de fer[1] est ajoutée après l'apparition du rouge

1. A la dose de 0,5 pour 100, les sels de fer produisent encore le même effet, ce qui met le métal dans la solution de tyrosine à la proportion de 1 : 40,000. Sous une proportion moindre, le fer se reconnaît encore à des modifications, sinon à la suppression complète du rouge; et, en tout cas, il joue le rôle des autres sels pour précipiter et décolorer finalement la liqueur.

normal, on voit cette couleur ternir, faire place au vert et au bleu, et le cycle de ses transformations s'achever comme dans le premier cas. C'est donc une réaction des sels de fer sur la matière colorante rouge, à laquelle la nature de l'acide du sel est indifférente aussi bien que le degré d'oxydation du métal : le perchlorure de fer la produit aussi. Et l'apparition du vert est, en fait, le seul phénomène inattendu dans cette expérience. Car, à partir de ce point, c'est la succession de nos teintes accoutumées que nous retrouvons, avec une prédominance singulière du bleu, et une pureté comme une durée telles que nous n'en avons pas encore eu d'exemple [1]. Les sels de zinc produisent aussi du bleu, et le lactate de zinc, par exemple, à la même dose, met mieux en valeur cette couleur et assure mieux sa pureté et sa durée, parce qu'il ne donne pas naissance à du vert comme le font les sels de fer; par contre, de beaux violets résultent de la combinaison du bleu avec le rouge persistant, au moins au début de l'expérience.

II

ACTION DES SELS MINÉRAUX

Les expériences citées plus haut, où j'ai mis en série des dilutions diastasiques croissantes, m'ont fait voir encore d'autres particularités que celles que j'ai relatées. J'ai constaté, à plusieurs reprises, de grandes irrégularités dans l'apparition de la couleur. C'étaient des retards variables, qui portaient sur les numéros les plus élevés de la série et étaient généralement proportionnels au degré de dilution de la diastase qui y entrait. J'ai relevé ainsi jusqu'à trente et quarante jours de retard pour l'apparition de la couleur avec des dilutions au cinquantième et au soixantième. Ce phénomène ne s'est pas reproduit toutes les fois que j'ai fait usage de diastase aussi diluée. Mais, toutes les fois qu'il s'est

1. Il suffirait donc de la présence du fer sous une quantité et un état appropriés, pour donner du bleu, à l'exclusion du rouge et du noir, dans le mélange de tyrosine et de tyrosinase qu'offre, dans les conditions naturelles, la Russule noircissante. Est-ce l'artifice dont a usé la nature pour faire apparaître le bleu dans certaines espèces de champignons qu'on sait qui bleuissent également sous l'influence d'un ferment oxydant? Je n'ai pas eu d'échantillons de ces espèces à ma disposition pour contrôler cette vue de l'esprit.

montré, la coloration tardive était bien du fait de la diastase, et non de l'intervention accidentelle d'un microbe capable de rougir la tyrosine comme celui que j'ai étudié [1].

D'ailleurs on peut, déjà dans les limites de temps d'une expérience ordinaire, se rendre compte des retards que la dilution peut engendrer. Une solution diastasique qui donnait, à l'état de pureté, la coloration en quelques minutes, diluée au cinquième, l'a fait attendre une demi-heure; au dixième, le retard a atteint une heure. Le même rapport du simple au double, mais entre des dilutions de titre bien plus élevé, du trentième au soixantième, a causé une différence de quatre heures et demie dans l'apparition des couleurs [2].

Voici un exemple de proportionnalité en série :

Une dilution de diastase au tiers exigea.....		10 minutes.
—	— au quart exigea....	1 h. 10.
—	— au cinquième exigea.	1 h. 16.
—	— au sixième exigea..	1 h. 45.
—	— au septième exigea.	3 h. 20.

L'expérience suivante conduit par une autre voie à des effets analogues. Des tubes scellés, contenant des quantités égales de glycérine diastasique, ont été immergés en même temps dans un bain-marie à 68°. De cinq en cinq minutes un tube est retiré. On a ainsi une série de temps croissants de séjour à cette température : progressivement 5, 10, 15, jusqu'à 30 minutes. Il reste encore de la diastase intacte après ce dernier délai, très approché du terme où elle est entièrement détruite. Mais il en a été détruit dans chaque tube une quantité proportionnelle au temps

1. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1898, p. 1033.

Outre que le développement de la couleur diffère suivant son origine microbienne ou diastasique, voici comment on peut distinguer les deux cas : la couleur due à la diastase, même passée au brun havane et vieille de plusieurs mois, précipite toujours par quelques gouttes de solution d'un sel alcalino-terreux; la couleur due à un microbe ne précipite pas. J'ai vérifié ce moyen de diagnostic, non seulement avec les cultures du microbe que j'ai étudié, mais aussi dans le cas qui n'est pas rare (Bougault, *Soc. de Biologie*, 1897, p. 455) de rosissement de la solution de tyrosine exposée à l'air libre et accidentellement ensemencée par les germes de l'air.

2. Il faut sans doute rattacher à la même cause les faits observés par M. Bourquelot avec les macérations de divers champignons à tyrosinase : « Avec certaines macérations, la coloration se produit presque aussitôt le mélange fait; avec d'autres, au contraire, l'opération étant conduite, d'ailleurs, de la même façon, on ne voit apparaître la teinte rouge qu'au bout de 10, 15 minutes et même davantage. » *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1896, p. 811.

de chauffe, de sorte que chacun d'eux en représente une solution de titre différent et de faiblesse croissante avec ce temps. Une goutte de chacun est introduite dans un tube correspondant qui contient deux centimètres cubes de solution de tyrosine :

5 et 10	se colorent en	24 heures.
15	n'est coloré que le	4e jour.
20 et 25	— —	5e —
30	— —	6e —

J'ai pensé que l'élément minéral qui accompagne la diastase, que le chauffage épargne, et qui est capable, comme nous avons vu, de modifier la couleur, pouvait être aussi la cause des retards apportés à son apparition. L'étude des diastases est bien propre à suggérer cette hypothèse : elle ne manque pas d'exemples d'actions paralysantes exercées par des sels divers qui influencent sinon, comme il se rencontrerait ici, le début de l'action diastasique, du moins sa durée et son parachèvement.

J'ai vu d'abord qu'en ajoutant au mélange-étalon un nombre croissant de gouttes de la liqueur glycérinée où la diastase avait été préalablement détruite par la chaleur, l'apparition de la couleur était retardée proportionnellement au nombre de ces gouttes et en comparaison avec un témoin, de

18	minutes pour	6 gouttes.
49	— —	8 —
67	— —	10 —

J'ai ensuite expérimenté différents sels. En raison de la difficulté que nous avons reconnue de mesurer, pour notre diastase, le progrès croissant de son action qui repose sur des nuances, je ne devais pas m'attendre à pouvoir mieux apprécier l'influence des sels, si, comme pour les autres diastases, elle s'exerçait au cours de cette action. Mais il était nécessaire et il suffisait, autant pour permettre une appréciation que pour vérifier mon hypothèse, que l'addition des sels se traduisît par un retard dans le début de la coloration.

C'est ce qui s'est réalisé, en effet, et qui m'a permis de délaisser le terrain de mesure habituel, hors de notre portée, je le répète, dans l'espèce.

A la dose de dix gouttes de solution saturée à la température

de 20°, dans le mélange-étalon, les sels suivants ont causé des retards sur le témoin, qui ont varié de 25 minutes à 3 heures :

Azotate de potasse.	Chlorure de baryum.
Chlorure de potassium.	Chlorure de calcium.
Azotate de soude.	Chlorure de strontium.
Sulfate de soude.	Sulfate de magnésie.
Phosphate d'ammoniaque.	

Oxalate d'ammoniaque, oxalate de potasse et fluorure de sodium ont encore dépassé ce retard, et la couleur s'est bornée au rose du début pour eux.

Le retard est augmenté avec la quantité de sel; ainsi il a été de :

3 jours	pour	1 centigramme	de phosphate	d'ammoniaque.
4 —	—	2 centigrammes	—	—
9 —	—	5 —	—	—

Entre 10 et 20 milligrammes d'oxalate d'ammoniaque la différence de temps a été de 4 jours.

Ces sels sont neutres. Une réaction alcaline du sel ajouterait une cause de retard : 1 goutte de solution normale décime de soude, ce qui met le mélange au titre de 1 : 30,000 environ de Na^2O, a produit un retard de 17 jours.

Sans doute, il y a encore loin de ces retards dus aux sels neutres aux retards considérables que nous avons obtenus en diluant simplement la diastase. Mais contentons-nous, pour le moment, d'avoir constaté que l'influence des sels peut aussi s'exercer dans ce sens [1]. Nous retrouverons plus loin dans d'autres circonstances des retards plus prolongés.

J'ai recherché si des faits analogues ont été observés avec

1. L'accélération d'action que certains sels provoquent chez les autres diastases aura son équivalent, pour notre diastase, dans la précocité de son début, en comparaison du temps nécessaire à un témoin qui n'aura pas reçu de sel. Acides sous une faible dose, azotate et sulfate d'ammoniaque ont, vis-à-vis de la tyrosinase, cette propriété accélératrice, où il n'entre pas dans mon plan d'insister davantage. Il faut y joindre les sels de fer. Aux doses précédemment indiquées, l'apparition de la couleur verte ne demande que quelques minutes, contre une demi-heure nécessaire au rose qui ne subit pas cette influence. Le contraste est bien accusé dans l'expérience suivante : un petit cristal de sulfate de fer est déposé au fond d'un tube, puis surmonté avec précaution d'une colonne liquide du mélange-étalon; une zone rouge apparaît, qui passe bientôt au bleu, au voisinage du sel de fer, par l'éveil anticipé de la diastase qui met à profit l'oxygène dissous, longtemps avant que la couleur se montre à la surface où l'accélérateur ne se fait pas sentir si la provision d'air y est plus abondante.

les autres diastases. Mais remarquons que, faute d'une réaction aussi frappante qu'une couleur, il ne s'y rencontre pas des conditions aussi favorables à une semblable constatation. La difficulté est accrue, chez la plupart d'entre elles, de la nécessité de recourir à des réactions chimiques pour vérifier leurs effets. Aussi je n'ai pas trouvé que ce point ait été spécialement visé en ce qui les concerne. Il semble d'ailleurs résulter de tous les travaux auxquels elles ont donné lieu, que les diastases entrent en action, aussitôt qu'elles sont mises en contact avec leur substance passive. Ou bien, c'est l'ajournement définitif de leur action, qu'on trouve signalé du fait de la température[1], de la viscosité[2], de l'extrême dilution. Il n'y a rien là que la tyrosinase ne reproduise et elle ne se distingue pas sur ces points des autres diastases.

Mais où elle offre bien une originalité propre, c'est dans cette période de retard au début, variable, comme nous avons vu, avec les conditions qui s'influencent réciproquement du taux de la diastase et de la dose des sels. Que se passe-t-il alors? Il faut admettre que ce temps d'inertie apparente est employé à un travail tout intérieur de préparation, qui échappe à nos moyens d'investigation actuels. Si le fait n'a pas encore été signalé pour les diastases, on sait depuis longtemps que dans les réactions chimiques ordinaires il faut faire état de ce *temps mort*. M. Duclaux a beaucoup insisté sur ce point dans ses *Études sur l'action solaire*[3], dans lesquelles il étudiait comme moi un phénomène d'oxydation. M. Duclaux observait ce *temps mort* au commencement de l'expérience où il exposait une solution d'acide oxalique à l'action solaire qui devait le transformer en acide carbonique, et il a signalé des cas nombreux dans lesquels on le retrouve.

1. Pour la tyrosinase, à 0°, il faut un plus long temps pour qu'elle débute, mais l'action s'exerce encore. La température optima, avec *ma* solution glycérinée, s'est trouvée entre 45° et 50°, où le départ de la coloration est abaissé de 30 à 15 minutes dans le mélange-étalon.

2. Si l'on a substitué la glycérine à l'eau comme dissolvant de la tyrosine dans le mélange-étalon, il n'y a plus de coloration. C'est alors une curieuse expérience que de tirer de ce mélange incolore, à peine ambré même après huit jours, une belle couleur rose, par une simple addition d'eau sous le volume d'un cinquième seulement. Ne serait-ce pas aussi la viscosité, accrue dans le contenu des cellules végétales sous l'influence de l'évaporation si active pendant le jour, qui rendrait compte du ralentissement diurne de certains phénomènes diastasiques des feuilles? (V. Duclaux, *Microbiologie*, t. II, ch. VI.)

3. Ces *Annales*, t. X, 1896, p. 129.

Du même ordre sont sans doute ces faits d'observation journalière, où des réactifs réputés pour leur énergie et leur spécificité, peut-on dire, semblent hésiter et mettent un temps appréciable avant de révéler la présence, en quantités minimes, des corps dont ils sont les réactifs qualifiés : tels l'oxalate d'ammoniaque avec les sels de chaux, les chlorures avec l'azotate d'argent, etc. Il en va de même de la coloration produite par la tyrosinase dans une solution de tyrosine, si rapide, quand on se sert de la première à la façon d'un réactif, sans compter, si lente à apparaître quand on opère par goutte ou en présence de certains corps. Et pour cette dernière condition de retard, nous ne manquons pas encore d'analogies en chimie générale, où l'on voit incessamment que les réactions réputées les plus sûres peuvent être contrariées par la présence de petites quantités de certaines substances, telles que les matières organiques.

En quoi consiste le travail moléculaire qui s'accomplit pendant cette période de torpeur apparente commune à tant de réactions de la chimie? La question, pour s'être posée si souvent, n'a pas eu plus tôt de réponse, et ne saurait en tout cas nous retenir davantage. Il doit nous suffire d'avoir mis de niveau avec des faits bien connus un phénomène qu'on eût pu être tenté de revêtir de ce caractère mystérieux qu'on prête encore si volontiers aux diastases et à tout ce qui s'y rattache.

III

ACTION DES MATIÈRES ORGANIQUES

Nous n'avons encore vu la tyrosinase qu'aux prises avec des éléments de nature minérale. Nous devions nous demander comment elle réagirait à certains produits ou milieux organiques. A ce point de vue, c'est du côté des sérums animaux que les recherches actuelles sont le plus volontiers orientées, et que nous pouvions aussi espérer, d'après les faits déjà acquis à la science, rencontrer le plus de résultats intéressants. En effet, MM. Morgenroth [1], A. Briot [2], F. Mesnil [3], ont le plus récemment

1. *Centralbl. f. Bakt.*, t. XXVI, 1899, p. 349.
2. *Loco. citato* et *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, CXXVIII, p. 1359.
3. Ces *Annales*, t. XV, 1901, p. 352.

montré, avec des présures, que l'action diastasique était empêchée par divers sérums. J'ai expérimenté, à mon tour, sur la réaction de la tyrosinase, les sérums de quelques animaux : cheval, génisse, lapin, mouton, porc, veau. J'ai procédé comme pour les dilutions aqueuses : j'ai mélangé une goutte de glycérine diastasique avec des nombres croissants de gouttes de ces sérums et j'ai reporté une goutte de chaque mélange dans 2 c. c. de solution de tyrosine. Tout d'abord, avec tous ces sérums, la dilution jusqu'à 12 gouttes a laissé apparaître la coloration dans les 24 heures. Au-dessus de cette quantité, je donnerai comme exemple les effets de la dilution à 40 gouttes. C'est, en effet, le titre où, quand on se sert d'eau, le retard est assez régulièrement de 2 jours; j'ai eu, une fois, un retard de 3 jours. Au delà, les irrégularités sont plus fréquentes, plus capricieuses. Donc, la dilution à 40 gouttes a causé des retards de coloration du mélange-étalon, de :

9 jours	avec le	sérum	de veau,
8 —	—		de mouton,
6 —	—		de porc,
5 —	—		de cheval,
3 —	—		de génisse.

Quant au sérum de lapin, un échantillon a causé exceptionnellement un retard de 4 jours dès la dose de 12 gouttes; un autre est brusquement monté à 11 jours pour 15 gouttes. Nous n'avons que faire d'autres données en ce qui le concerne pour ce qui doit suivre.

On voit que ces sérums n'ont pas donné de retards aussi prolongés que la dilution à l'eau simple qui, sous le volume de 50 gouttes, je le rappelle, a causé un retard d'un mois. Je n'ai rien gagné à porter à cette dose, même le sérum de veau qui s'est montré le plus actif.

Au contraire, l'albumine de l'œuf de poule a donné des résultats plus comparables à ceux de l'eau. C'est ainsi que

12 gouttes	ont retardé	de.....	16 jours.
14 —	—	.....	23 —
21 —	—	.....	29 —

Ces chiffres sont empruntés à trois œufs différents parmi une douzaine que j'ai expérimentés. On trouve, en effet, dans le

nombre, des différences individuelles très marquées : elles consistent en des irrégularités dans les retards, qui apparaissent aussi avec les dilutions aqueuses de titre élevé, mais qui se montrent plus tôt pour l'albumine, dès les faibles dilutions.

Il faut reconnaître qu'aucun des sels que nous avons expérimentés antérieurement ne nous a donné des retards équivalents à ceux de l'albumine; quand on dépasse avec eux une certaine dose, on obtient l'annihilation plutôt que des ajournements aussi longs, de l'action diastasique. Peut-être que, dans ces effets si prolongés de l'albumine de l'œuf, se superposent deux influences, celle de l'élément minéral inséparable des matières albuminoïdes et dont témoigne la coloration de la tyrosine, plus violette que rose, et l'influence de sa réaction alcaline, laquelle, entre parenthèses, ne rend que plus remarquable la durée de conservation de la diastase dans ces conditions si favorables à son altération. Cependant, un liquide d'ascite, plus comparable aux sérums, n'a pas montré l'action empêchante de ces derniers.

J'ai dû alors me demander s'il n'était pas possible d'exalter le pouvoir empêchant du sérum normal et de l'élever au niveau de celui de l'albumine. C'est désormais une notion bien assise que, pour les diastases aussi bien que pour les toxines, en injectant chez un animal des doses progressivement croissantes de ces corps, on fait acquérir au sérum de cet animal un pouvoir empêchant sur ces toxines et ces diastases; on traduit ce fait en disant qu'il s'est formé dans le sang une antitoxine ou une antidiastase. M. Morgenroth[1], M. Briot[1] ont constaté le fait pour la présure. Se vérifierait-il aussi pour la tyrosinase?

Pour éclaircir ce point, j'ai choisi le lapin comme animal d'expérience et, suivant la technique qui sera exposée plus loin, je l'ai soumis à des injections réitérées sous la peau, faites avec des macérations aqueuses de champignons qui contiennent de la tyrosinase. L'animal a bien supporté ces injections, et si parfois des abcès se sont formés, cela n'a pas affecté l'état général du sujet. Après un certain nombre d'injections (voir le détail à l'appendice), j'ai essayé le sérum, comme j'avais fait le sérum normal, en l'employant à diluer à des titres variables la glycérine diastasique et en éprouvant dans les conditions habi-

1. *Loc. citato.*

tuelles l'activité de chaque dilution. Voici les résultats que j'ai obtenus. Je rappellerai que, à une exception près, le sérum des lapins normaux, sous le volume de 12 gouttes, laissait encore la coloration apparaître dans les 24 heures.

Or, déjà avec 3 gouttes de sérum du lapin traité (I), la coloration s'est fait attendre 2 jours ; 5 jours pour 5 gouttes et jusqu'à 9 jours pour la dose de 7 gouttes. Mais on retrouve les différences individuelles inhérentes à toutes ces expériences.

Il a fallu avec un autre animal (II) 4 gouttes pour retarder de 2 jours, 8 gouttes pour 6 jours.

Avec un troisième lapin (III), 5 gouttes étaient nécessaires pour produire 2 jours; 10 gouttes pour 5 jours de retard. La marche de l'expérience est résumée dans les tableaux suivants qui reproduisent une série pour chacun des deux derniers animaux.

L'apparition de la couleur était assez régulière, offrant un intervalle de 24 heures pleines entre deux tubes voisins : fréquemment le tube, laissé incolore la veille au soir, a montré le rose à ses débuts, le lendemain matin. Mais encore retrouve-t-on ici les irrégularités que montre le phénomène diastasique dès qu'il subit une influence étrangère : le même nombre de gouttes n'amène pas toujours le même retard dans deux expériences successives ; le retard peut être plus considérable pour une dilution moindre que pour une plus élevée. La coloration qui succédait aux retards les plus prolongés restait fort au-dessous de celle d'une dilution aqueuse de titre correspondant, et il y avait déjà une atténuation marquée pour les premiers retards. Ajoutons enfin que, aussi bien pour le sérum normal que pour le sérum des animaux traités, le chauffage à 60° pendant une demi-heure a laissé intact le pouvoir empêchant.

Comme on voit par le lapin II, à partir d'un certain chiffre, on ne gagne rien à augmenter le nombre de gouttes. Je me suis, d'ailleurs, interdit de dépasser 12 gouttes. Ce sont les limites, on se le rappelle, où le sérum normal qui est notre terme de comparaison maintient le retard dans l'unité de temps, 24 heures. A partir de cette dose, en effet, nous avons vu ce sérum normal lui-même déterminer des retards tels qu'on ne pourrait plus conclure avec certitude et démêler la vraie cause dans des expériences poursuivies avec des doses plus élevées. J'ai vu

TEMPS de retard en jours.	TITRE DE LA DILUTION EN GOUTTES									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
LAPIN II										
1	+	+	+							
2				+						
3					+	+				
4							+			
5										
6								+	+	+
LAPIN III										
1	+	+	+	+						
2					+	+				
3							+	+		
4									+	
5										+
6										

Les + marquent l'apparition de la couleur.

aussi, pour contrarier les expériences prolongées avec le sérum, y survenir plus tôt qu'en présence de l'albumine l'atténuation de la couleur du fait de la dilution et du retard, et l'envahissement par les germes microbiens. Ces expériences suffisent d'ailleurs pour confirmer la règle générale et établir la possibilité de créer

ou de renforcer le pouvoir empêchant du sérum des animaux, vis-à-vis de la tyrosinase aussi bien que des autres diastases et des toxines.

De telle sorte qu'on pourrait dire, conformément aux idées et à la terminologie adoptées, que nous avons obtenu l'anticorps ou l'antidiastase, l'*antityrosinase*. Je me garderai pourtant de tenir ce langage. Il ne ferait que superposer un mot de convention à notre ignorance de la chose et créer, au profit d'idées systématiques, une entité qui n'est rien moins que démontrée. Je ne me suis pas davantage inspiré de ces idées pour chercher à cette entité douteuse des attributs définis et, par exemple, examiner si le pouvoir empêchant disparaissait avec la précipitation du sérum par l'alcool ou avec son exposition à une température élevée et prolongée : les conclusions qu'on peut tirer de ces expériences sont passibles d'interprétations trop contradictoires. Mais, ayant ainsi vidé ce terme d'antityrosinase des idées d'être et d'attributs fictifs qui lui serviraient de supports, on pourrait le retenir pour la commodité du discours, n'en plus borner l'emploi aux cas où le sérum est en cause, et je ne vois pas ce qui empêcherait de dénommer aussi bien antityrosinases tous les sels que nous avons vus capables d'empêcher l'action de la diastase.

Je ne veux pas entrer plus avant, pour le moment, dans l'étude de cette question. Elle présente un grand intérêt, en ce sens que pour la première fois, à ma connaissance, le corps vis-à-vis duquel l'inoculation à un animal a fourni, dans le sérum de cet animal, un corps *anti*, est un élément normal et bien défini, même cristallisé, de nos tissus. Il y a de la tyrosine dans presque tous les sucs organiques, et il y a au moins un chaînon contenant en puissance de la tyrosine dans la plupart des matières albuminoïdes. Mais toutes ces circonstances qui donnent de l'intérêt à l'étude de la tyrosine, de la tyrosinase et de l'anticorps augmentent aussi la difficulté de cette étude. C'est pour cela que je me borne pour le moment à l'étude chimique qui précède, et qui peut servir d'amorce et de guide pour l'étude physiologique qui reste à entreprendre.

APPENDICE

La liqueur glycérinée qui a servi à toutes mes expériences a

été préparée, au mois de juillet 1900, avec diverses espèces de Russules et de Lactaires, à la proportion de 255 grammes de champignons pour 860 grammes de glycérine. Elle s'est bien conservée jusqu'à ce jour. La seule précaution à prendre est d'avoir un petit flacon de débit pour les prélèvements réitérés, afin de réduire la quantité qui, dans les fréquents débouchages, peut attirer l'humidité de l'air et perdre un peu du degré primitif de concentration de la diastase. Avec le contenu de mon flacon de réserve, exposé le moins possible à cette cause légère d'altération, le mélange-étalon rosit actuellement en un peu moins d'une demi-heure. Toutes les expériences doivent d'ailleurs être faites en comparaison avec un témoin.

La solution de tyrosine était à la proportion de 0,05 0/0, la dissolution et la stérilisation assurées en même temps par un court passage à l'autoclave.

Des tubes stérilisés servaient aux expériences qui n'ont généralement pas souffert de contaminations microbiennes. Toutes les expériences ont été faites dans des tubes à essai de calibre ordinaire : il y a une grande différence entre les tubes et les vases à fond plat tels que les cristallisoirs pour la rapidité des progrès de la coloration, à raison de l'inégal afflux d'air.

L'eau distillée stérilisée servait aux dilutions. Quelle que fût la nature du liquide, eau, albumine, sérums normal ou préparé, la dilution était faite 24 heures avant l'emploi. Ce détail n'est pas indifférent. La série des dilutions aqueuses, mise en expérience aussitôt que préparée, ne me donnait plus le curieux contraste de rose et de violet que j'ai signalé à partir d'un certain degré de dilution : tous les tubes gardaient alors le rose. Dans le délai que j'ai réservé d'ordinaire, un commencement d'altération de la diastase s'ajoute vraisemblablement à la dilution pour produire ce curieux effet.

Les champignons qui ont servi aux injections, diverses espèces de Russules, avaient été séchés soit dans le vide sulfurique, soit à une douce chaleur d'étuve, 40°. Pulvérisés au moment de l'emploi, broyés et laissés en contact une douzaine d'heures avec de l'eau chloroformée, dans la proportion de 3 grammes pour 15 c. c., le mélange était exprimé à l'étamine, le liquide filtré à la bougie Chamberland qui ne diminue pas sensiblement la force diastasique, et mis à la dose de

10 c. c. sous la peau du flanc des animaux d'expérience.

Pour le premier lapin, c'est une macération en eau chloroformée, préparée dès la récolte avec 340 grammes de champignons pour 400 grammes d'eau, qui a servi aux injections, et s'est bien conservée pendant les deux mois qu'a duré l'expérience.

Un intervalle de six jours en moyenne était mis entre les injections.

Le lapin I a reçu 80 c. c. en 8 injections, dans 48 jours, où son poids a monté de 1,590 à 1,990.

Le lapin II a reçu 102 c. c. en 11 injections, dans 74 jours, où son poids a monté de 1,890 à 2,560.

Le lapin III a reçu 65 c. c. en 9 injections, dans 61 jours, où son poids a monté de 1,780 à 2,110.

On a vu, par les tableaux, que le pouvoir empêchant du sérum n'a pas sensiblement bénéficié de l'écart de 65 à 102 c. c. entre III et II, mis parallèlement en expérience, et qui ont partagé souvent la même macération de champignon.

DE LA CHIMIOTAXIE NÉGATIVE DES LEUCOCYTES DES LAPINS INFECTÉS PAR LA CULTURE PURE DE BACILLES DU CHOLÉRA DES POULES

PAR MM. A. ZILBERBERG ET J. ZELIONY

La chimiotaxie négative des leucocytes a été mise en évidence en 1884 par M. Metchnikoff[1]. Ce savant, en examinant les organes des lapins et des cobayes, animaux très sensibles au charbon et morts de cette infection, a remarqué que le phénomène d'englobement des bactéries par les leucocytes faisait défaut dans ce cas. Et cependant les leucocytes avaient conservé leurs mouvements amiboïdes, c'est-à-dire n'étaient pas empoisonnés. De plus, après avoir injecté sous la peau d'une oreille de lapin du vaccin charbonneux et sous la peau de l'autre oreille de la culture virulente de bactéridies, M. Metchnikoff a pu constater qu'à l'endroit de la deuxième injection la phagocytose existait, mais moins nette, moins intense que sous la peau de la première oreille.

M. Metchnikoff a expliqué l'existence de la phagocytose au niveau de l'injection de la culture virulente par la présence dans cette culture d'un grand nombre de bactéridies non virulentes. En effet, il n'a pas pu trouver de phagocytose chez des lapins qu'il a injectés avec des bactéridies prises directement dans la rate d'animaux morts de charbon.

Depuis, on a constaté maintes fois que les leucocytes d'un animal très sensible à une espèce microbienne n'englobent pas les microbes virulents de cette espèce, même quand ils sont en contact intime avec eux. Il n'en est pas de même pour les bactéries non virulentes qui sont englobées par des leucocytes.

1. METCHNIKOFF, Uber die Beziehung der Phagocyten zur Milzbrandbacillen, *Virchow's Archiv.*, 1884, Bd. 97.

M. Gabritchevsky[1] a remarqué, qu'une culture jeune(n'ayant pas dépassé 24 heures(de bacilles du choléra des poules n'attire pas les leucocytes du lapin, qui est cependant très sensibles à cette infection. Les mêmes bacilles provenant de cultures plus vieilles commencent déjà à attirer des leucocytes.

M. Massart[2] a étudié en 1892 l'attitude des leucocytes à l'égard des microbes virulents et non virulents. Il introduisait dans la cavité abdominale de lapins, de cobayes et de pigeons, des tubes capillaires remplis de culture virulente ou non virulente de microbes du charbon, du choléra des poules, du hog-choléra, de la diphtérie, du pus bleu, du rouget du porc et du *Vibrio Metchnikowi*. Les cultures de microbes non virulents attiraient un nombre considérable de leucocytes, tandis que les microbes virulents attiraient faiblement ou n'attiraient pas du tout, exception faite pour les bacilles de la diphtérie, dont les cultures virulentes attiraient un grand nombre de leucocytes.

Bordet[3] a étudié les leucocytes en présence des streptocoques virulents injectés dans la cavité abdominale du lapin ou du cobaye. Les leucocytes n'englobaient pas les streptocoques les plus virulents développés dans l'organisme de l'animal, et cela tout en les entourant en grand nombre et en étant en contact constant avec eux. Le même auteur[4] a remarqué que ces mêmes streptocoques, qui ne se laissent pas englober par des leucocytes, sont munis d'une auréole qui prend une teinte violet rose après la coloration par le bleu de Kühne. Les streptocoques qui viennent d'un milieu artificiel et qui subissent la phagocytose ne présentent pas cette auréole.

De plus, M. Bordet a montré que l'absence de phagocytose des streptocoques virulents n'est pas la conséquence de l'empoisonnement des leucocytes. Pour cela, il injectait dans la cavité abdominale du lapin des bacilles de la diphtérie ou des *proteus vulgaris*, après y avoir introduit préalablement des streptocoques. L'examen de l'exsudat abdominal a montré que les leucocytes

1. Gabritchevsky, Sur les propriétés chimiotactiques des leucocytes, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890.

2. Massart, Le chimiotaxisme des leucocytes et l'immunité, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

3. Bordet, Recherches sur la phagocytose, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1896.

4. Bordet, Contribution à l'étude du sérum antistreptococcique, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897, p. 179.

englobaient d'une façon énergique les bacilles de la diphtérie et des *proteus vulgaris*, et laissaient libres les streptocoques.

Dans l'expérience suivante, M. Bordet a démontré à quel point les leucocytes supportent l'action d'une toxine aussi forte que celle de bacilles de la diphtérie. Il inocule à un cobaye de la culture virulente de bacilles diphtériques. L'animal meurt 24 heures après l'inoculation. Une demi-heure après la mort de l'animal, M. Bordet prend un peu d'exsudat dans lequel se trouvent des leucocytes, y ajoute des streptocoques, met ce mélange à l'étuve et constate dans ce cas une phagocytose intense des streptocoques.

Marchand[1] a montré aussi que les leucocytes du lapin du cobaye et ceux du chien dévorent très avidement les streptocoques non virulents, tout en respectant les streptocoques virulents. Le bouillon provenant de la filtration d'une culture de streptocoques virulents, saturé par conséquent de produits vitaux de ces microbes, n'a nullement influencé la propriété phagocytaire des leucocytes qui y étaient introduits.

Toute autre a été la conclusion de M. Werigo[2] dans son travail fait en 1894. Cet auteur injecte une grande quantité de culture de bactéridies du charbon dans la veine auriculaire des lapins, et tue ces animaux à des intervalles différents. Dans ce cas il trouve que presque tous les organes de ces animaux présentent pendant toute la durée de l'infection une phagocytose notable qui disparaît un peu avant la mort de l'animal. M. Werigo en conclut que la chimiotaxie négative n'existe pas chez les animaux à sang chaud, puisque les leucocytes du lapin, très sensible au charbon, dévoraient des bactéries qu'il considérait comme virulentes.

Des expériences analogues ont été exécutées par MM. Werigo et Egounoff[3] avec des bacilles du choléra des poules, auxquels le lapin est encore plus sensible qu'au charbon. Ayant obtenu les mêmes résultats que dans ses premières expériences, M. Werigo s'est encore affermi dans sa première opinion.

1. Marchand, Étude sur la phagocytose des streptocoques atténués et virulents, *Archives de médecine expérimentale et d'anatomie pathologique*, 1898.

2. Werigo, Développement du charbon chez le lapin, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.

3. Prof. Werigo et Egounoff. Contribution à l'étude sur l'immunité. *Archives russes de Pathologie générale*, etc., 1898.

Au moment où nous terminions la rédaction de ce mémoire, paraissent les recherches de M. Tchistovitch[1] consacrées également à la question de la chimiotaxie négative. Ce dernier injectait 3 1/2 à 4 c. c. de culture virulente de streptocoques dans la veine auriculaire du lapin et tuait ces animaux à des intervalles différents. L'examen microscopique du foie, de la rate, du rein et de la moelle osseuse n'a montré aucune phagocytose. Ce n'est que dans les poumons que M. Tchistovitch a pu trouver une phagocytose insignifiante, qui disparaît dans les stades ultérieurs de l'évolution de la maladie.

Ainsi, tous les auteurs mentionnés plus haut, à l'exception de MM. Werigo et Egounoff, ont confirmé dans leurs expériences l'existence de la chimiotaxie négative. MM. Werigo et Egounoff, en se basant sur des travaux contradictoires aux travaux des autres auteurs, nient l'existence de la chimiotaxie négative des leucocytes chez les animaux à sang chaud.

II

Nous avons choisi le microbe du choléra des poules pour notre étude de la chimiotaxie négative des leucocytes. Ce sujet nous a été inspiré par M. Bardach, privat-docent, à qui nous sommes heureux d'apporter ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

Le lapin étant très sensible au choléra des poules, la chimiotaxie négative doit être très marquée dans son organisme, d'après la théorie de Metchnikoff, pendant l'évolution de cette maladie. D'un autre côté l'évolution du choléra des poules chez le lapin est justement une preuve, pour MM. Werigo et Egounoff, de la non-existence de la chimiotaxie négative des leucocytes chez les animaux à sang chaud.

Il était donc d'autant plus intéressant de trouver la cause de cette diversité d'opinions.

1. Tchistovitch. *Archives russes de Pathologie générale*, 1900. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900.

Nous avons d'abord fait des expériences analogues à celles de MM. Werigo et Egounoff. Pour cela, nous avons injecté dans la veine auriculaire de 3 lapins, et pour chacun d'eux, 4 c. c. d'émulsion, dans l'eau physiologique, d'une culture sur gélose, de 20 heures, de bacilles virulents du choléra des poules. Chaque lapin recevait ainsi le contenu de 3-4 cultures sur gélose. Un de ces lapins a été tué 4 minutes après l'inoculation, un autre 6 minutes, et le troisième 8 minutes après l'inoculation. Leurs organes ont été examinés en frottis et sur des coupes. Les morceaux d'organes ont été fixés dans l'alcool et le sublimé, et ensuite paraffinés. La coloration des coupes a été faite par la méthode de Nicolle [1] (passage des coupes, après le bleu de méthylène, dans la solution aqueuse de tannin à 10 0/0). On complétait la coloration par l'éosine.

Les préparations des frottis ont été faites avec du bleu de méthylène.

L'examen du foie, de la rate, du poumon et du sang du cœur de ces lapins a montré une phagocytose très marquée des leucocytes et des macrophages. A côté des microbes englobés par les leucocytes, on a trouvé cependant des microbes libres [2].

Ainsi, en injectant une grande quantité de bacilles virulents du choléra des poules dans la veine auriculaire du lapin, on peut trouver dans les organes de cet animal une phagocytose très nette. Cependant ces expériences, pas plus que celles de MM. Werigo et Egounoff, ne parlent contre l'existence de la chimiotaxie négative des leucocytes à l'égard des cultures virulentes du choléra des poules. On peut déjà *a priori* admettre que dans une culture virulente, qui s'est développée sur un milieu artificiel, il existe beaucoup de microbes non virulents à côté des microbes virulents. Les microbes non virulents sont évidemment ceux qui se sont développés sur un milieu artificiel après les autres et dans des conditions de nutrition moins favorables (par exemple, à la surface de la pellicule microbienne sur gélose). L'existence des éléments non virulents dans une

1. Nicolle, Méthode de recherche des microorganismes qui ne se colorent pas par le procédé de Gram. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

2. Les cultures qui ont servi pour ces expériences venaient d'un lapin mort 11 heures après l'injection sous-cutanée de 1/10e d'une culture sur gélose de ce choléra des poules, de 24 heures. Dans les expériences ultérieures, les cultures provenaient de l'ensemencement fait avec des organes du dernier lapin mort au cours d'une expérience.

culture virulente des bactéridies du charbon (prises dans un milieu artificiel) a été indiquée par M. Metchnikoff en 1884, comme cela a été indiqué plus haut. Dans ces conditions, les expériences mentionnées plus haut, ainsi que celles pratiquées par MM. Werigo et Egounoff, ne peuvent pas aider à éclaircir la question de la chimiotaxie négative des leucocytes vis-à-vis des microbes virulents, puisque dans ces expériences on injectait dans le sang des animaux des microbes virulents en même temps que des microbes non virulents.

Nous avons voulu conduire nos expériences de telle sorte qu'on pût juger d'une façon irréprochable la manière dont se comportent les leucocytes vis-à-vis des microbes presque exclusivement virulents. Pour cela nous injections les microbes du choléra des poules sous la peau et dans la cavité abdominale des lapins. Dans ces conditions, les microbes qui passaient dans les organes s'étaient déjà développés dans l'organisme lui-même.

On inoculait les lapins avec 1/4 ou 1/2 culture sur gélose des bacilles du choléra de 24 heures, ensemencée avec des microbes pris toujours dans les organes de l'animal. On tuait les animaux en expérience 1, 2, 3, 3 1/2, 5 heures après l'inoculation, par un coup donné à la nuque[1]. Leurs organes (foie, rein, rate, moelle osseuse et poumon) ont été étudiés sur des frottis et dans les coupes. On a suivi la même technique que pour les expériences précédentes.

En sacrifiant ainsi les animaux à des intervalles différents après l'inoculation, nous sommes arrivé à saisir à peu près le début de l'apparition des bactéries dans les organes, à suivre leur développement, et surtout à éclaircir les rapports des leucocytes vis-à-vis des bactéries pendant ce temps.

En outre, dans un cas, nous avons étudié l'endroit d'inoculation (sur les frottis) pendant l'évolution de la maladie. Nous n'avons pas pu trouver de phagocytose à cet endroit ; les leucocytes, eux-mêmes, étaient très rares. Sur les coupes de la région d'inoculation (prise après la mort de l'animal), on a trouvé un grand nombre de bactéries, mêlées à une quantité insignifiante de leucocytes dans lesquels on pouvait rarement noter une faible phagocytose. L'examen des organes a montré que 2 heures

1. Les lapins infectés avec cette dose et abandonnés à eux-mêmes mouraient 3, 5, rarement 6 heures après l'injection.

après l'injection des bactéries du choléra des poules dans la cavité abdominable, on trouve déjà des microbes dans le foie. On en trouve au même moment dans la rate et dans les poumons mais en nombre moins grand que dans le foie. Il était impossible de déceler à ce moment des bactéries sur les préparations de sang de la veine auriculaire; les ensemencements de ce sang n'ont pas donné non plus de résultat. 3 heures après le commencement de l'expérience, on trouve déjà un nombre assez considérable de bactéries dans les organes cités plus haut, ainsi que dans la moelle osseuse. On en trouve le plus en ce moment dans le foie, puis dans la rate. Dans le sang de l'oreille, on peut trouver quelques rares bactéries. Notons en passant que l'apparition des bactéries dans le sang présente toujours les mêmes caractères. D'abord isolées, elles apparaissent plus tard par petits amas. Puis, leur nombre croît très rapidement et elles se répartissent régulièrement dans le sang. Au moment de la mort, on trouve le plus de bactéries dans le foie, la rate, la moelle osseuse; le moins, dans les reins et les poumons. Le moment de l'apparition des bactéries dans le sang subit, bien entendu, des oscillations; nos indications sur ce point, basées sur un nombre d'expériences relativement petit, n'ont qu'une valeur approximative.

Nous n'avons pas trouvé de phénomène de phagocytose dans les organes pendant toute la durée de la maladie. C'est à peine si parfois nous trouvions, après avoir parcouru plusieurs préparations, un leucocyte avec 2-3 bactéries englobées dans son intérieur au milieu d'une foule de bactéries libres. On ne peut pas non plus trouver de phagocytose dans le sang, dans lequel les bactéries n'apparaissent en quantité notable que 30 à 50 minutes avant la mort. Nous avons constaté seulement une phagocytose assez marquée des macrophages du foie. Nous avons pu également suivre sur le même animal l'attitude des leucocytes vis-à-vis des bactéries dans le foie pendant toute la durée de la maladie.

Après avoir injecté 1/4 de culture sur gélose de bactéries du choléra des poules en partie sous la peau, en partie dans la cavité abdominale, nous retirions de temps en temps du foie, au moyen d'un tube capillaire, une petite quantité de sang que nous examinons en frottis. Les bactéries apparurent dans le sang 3 h. 1/2 après l'injection; 1 heures 13 plus tard (par conséquent,

4 heures 43 après l'inoculation), le lapin était mort. Il a été impossible de trouver de phagocytose leucocytaire dans le foie pendant toute la durée de la maladie.

Ainsi, les bactéries qui passent dans les organes quelques heures après l'inoculation de l'animal sous la peau ou dans la cavité abdominale sont évidemment presque exclusivement des bactéries virulentes, qui se sont déjà développées dans l'organisme lui-même. L'existence dans les organes de chimiotaxie négative des leucocytes vis-à-vis de ces bactéries est incontestable.

Nous avons déjà vu comment se comportent les leucocytes vis-à-vis des bactéries du choléra provenant d'un milieu artificiel et injectées en masse dans le sang. Il fallait démontrer que, dans ce cas, les leucocytes englobent les individus non virulents qui se trouvent en grand nombre dans une culture virulente. Dans ce but, nous avons décidé, tout en suivant la même marche que dans les expériences précédentes, d'injecter uniquement des bactéries virulentes prises directement dans l'organisme infecté. Pour cela, nous avons voulu inoculer un lapin neuf avec du sang (préalablement défribriné) pris sur un autre animal infecté avec des bactéries du choléra des poules et un peu avant sa mort, c'est-à-dire au moment où son sang est riche en bactéries. Mais nous ne sommes pas arrivé à puiser dans la carotide une quantité de sang suffisante pour qu'il pût nous fournir approximativement autant de microbes que dans les cultures qu'on avait injectées dans la veine auriculaire du lapin dans les expériences précédentes : alors, pour avoir des bactéries accommodées à la vie dans l'organisme lui-même, nous avons profité de ce fait qu'on trouve dans la cavité abdominale de quelques lapins une quantité assez considérable de liquide, qui peut servir de milieu nutritif naturel pour les bactéries.

Nous avons injecté dans la cavité péritonéale d'un tel lapin une culture sur gélose, de 16 heures, de bactéries du choléra des poules diluée dans 10 c. c. d'eau physiologique. 3 heures après, quand l'examen de l'exsudat a montré l'existence d'un grand nombre de bactéries développées sur place avec une absence presque complète de phagocytose, nous avons commencé à recueillir cet exsudat avec la pipette. Nous avons ainsi recueilli

9 c. c., que nous inoculions dans la veine auriculaire du lapin neuf par doses séparées au fur et à mesure que nous en retirions de la cavité abdominale du premier lapin. La première dose d'exsudat fut de 4 c. c.; la deuxième dose, de 3 c. c., a été inoculée 15 minutes plus tard; enfin, la troisième dose, de 2 c. c., a été injectée 10 minutes après la deuxième. Ainsi, en l'espace de 25 minutes, un lapin neuf a reçu 9 c. c. d'exsudat abdominal avec des bactéries qui s'y sont développées. Cet animal a été tué 40 minutes après la première dose, c'est-à-dire 15 minutes après la troisième. Après avoir étudié le foie, la rate, les poumons et la moelle osseuse, nous avons constaté que le foie était le plus riche en bactéries, la moelle osseuse en contenait le moins! Le sang contenait des bactéries isolées. Dans tous ces organes, presque tous les microbes étaient libres. Nulle part nous n'avons trouvé de phagocytose tant soit peu marquée; on trouvait très rarement des leucocytes ayant englobé des bactéries. On ne trouvait des phénomènes de phagocytose qu'au niveau des macrophages du foie; et encore celle-ci était insignifiante.

Ne voulant pas nous borner à cet expérience, nous avons fait une expérience de contrôle. Pour cela, nous avons injecté à un lapin neuf à peu près la même quantité de bactéries du choléra des poules, provenant d'une culture sur gélose, et à mêmes intervalles. La virulence de cette culture a été la même que celle de la culture qui a servi à l'inoculation dans la cavité abdominale du lapin pour l'expérience précédente.

Le lapin a été tué 40 minutes après l'injection de la première, et 15 minutes après la dernière injection. Les organes de ce lapin contenaient moins de bactéries que les organes du lapin précédent, auquel on a injecté des microbes qui se sont développés dans l'exsudat de la cavité abdominale. On trouvait déjà une phagocytose assez marquée; cependant, on voyait toujours un nombre considérable de bactéries libres.

Ainsi, nous avons pu constater une différence marquée entre la culture provenant d'un milieu artificiel et celle qui s'est développée dans l'organisme affecté. Tandis que cette dernière ne contient presque exclusivement que des microbes virulents, la première contient également beaucoup de microbes non virulents, affaiblis, et qui se laissent englober par des leucocytes.

Une série d'expériences, instituées par nous dans le but de

suivre le sort que subissent ces bactéries dans la cavité abdominale, vient encore confirmer notre manière de voir.

Après avoir injecté dans la cavité abdominale du lapin des quantités différentes de culture sur gélose de bactéries du choléra des poules, nous examinions tous les 5-15 minutes l'exsudat de la cavité abdominale, jusqu'au moment de la mort de l'animal. Comme il est difficile d'extraire de la cavité abdominale, pendant plusieurs heures, de l'exsudat avec une quantité suffisante de leucocytes, nous avons provoqué la leucocytose artificielle. Pour cela, nous injections, la veille de nos expériences, 3-4 c. c. d'eau physiologique dans la cavité abdominale. Sur les lapins ainsi préparés, il était très facile d'étudier les rapports des leucocytes et des bactéries.

Dans le premier temps qui suit l'injection dans la cavité abdominale des bactéries du choléra des poules, on observe une phagocytose marquée, qui faiblit et enfin disparaît complètement. La disparition de ce phénomène commence à intervalles de temps différents, et dépend principalement de la quantité de bactéries injectées. Après l'injection de 1/10 d'une culture sur gélose, il est impossible de trouver la phagocytose déjà au bout de 1 à 2 heures. La phagocytose dure plus longtemps après l'injection d'une culture entière, et disparaît à peu près au bout de 3 heures. Cette différence tient probablement à ce que l'injection d'un plus grand nombre de bactéries non virulentes demande plus de temps pour leur englobement par des leucocytes. Les bactéries englobées par des leucocytes sont digérées, car elles montrent des signes évidents de dégénérescence.

On trouve cependant, pendant le premier temps qui suit l'inoculation, à côté des bactéries englobées, de nombreures bactéries libres. Puis, après la période de phagocytose, vient un moment où le nombre de bactéries englobées diminue, pendant que le nombre de bactéries libres augmente, et une ou deux heures avant la mort de l'animal, l'exsudat de sa cavité abdominale n'est pas moins riche en microbes du choléra des poules qu'une culture en bouillon de 24 heures. Et malgré cette richesse en microbes de l'exsudat péritonéal, les leucocytes n'englobent plus de bactéries déjà 1 à 3 heures après l'injection, et il en est ainsi jusqu'à la mort de l'animal. On trouve très rarement des leucocytes avec des bactéries englobées. On peut observer le même phéno-

mène sur des lapins, dans la cavité abdominale desquels on n'a pas provoqué de leucocytose artificielle, mais dans ce cas la phagocytose dure moins longtemps, à peu près 40 à 60 minutes. Cette différence tient au fait, observé par Pierallini[1], qu'une injection d'eau physiologique dans la cavité abdominale du lapin non seulement augmente le nombre de leucocytes dans cette région, mais encore renforce leurs propriétés phagocytaires.

Les lapins, chez lesquels on avait provoqué préalablement et d'une façon artificielle la leucocytose, mouraient de 5 à 8 heures après l'injection des bactéries du choléra des poules dans la cavité abdominale, tandis que les lapins non préparés mourraient 3 à 5 heures, rarement 6 heures après l'injection de la même dose de bactéries. La durée inégale de l'infection dans ces deux cas, indique à quel point les leucocytes interviennent dans la lutte de l'organisme contre l'infection.

Ainsi, toutes les expériences mentionnées plus haut montrent que les leucocytes du lapin, animal très sensible au choléra des poules, ne dévorent pas d'individus virulents de cette espèce, même quand ils sont en contact avec eux, c'est-à-dire qu'ils manifestent vis-à-vis de ces microbes une chimiotaxie négative. Ces expériences confirment en outre ce fait que les cultures virulentes de bactéries du choléra des poules qui se sont développées sur le milieu artificiel contiennent beaucoup d'éléments non virulents, qui sont immédiatement englobés par des leucocytes de l'organisme infecté.

III

Nous avons voulu voir si l'absence de la phagocytose du côté des leucocytes du lapin ne tient pas à ce fait que ces derniers sont empoisonnés par des produits toxiques des bactéries du choléra des poules, ce qui leur aurait fait perdre leurs propriétés phagocytaires. Pour cela, nous avons fait les expériences suivantes.

Nous avons injecté dans la cavité abdominale des lapins, où nous avions préalablement provoqué la leucocytose artificielle, des bactéries du choléra des poules. 2 à 4 heures après cette injection, lorsque, à l'examen microscopique de l'exsudat, nous consta-

1. Pierallini, Sur la phagocytose dans la cavité péritonéale, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897.

tions la pullulation d'un grand nombre de bactéries, et l'absence du phénomène de phagocytose, nous injections dans la même cavité abdominale 1/2 à 1 c. c. de culture non virulente de staphylocoques. Toutes les 5-15 minutes l'exsudat péritonéal de nos animaux a été étudié au microscope. Nous avons pu constater que les leucocytes, tout en se trouvant dans un exsudat beaucoup plus riche en bacilles du choléra des poules qu'en coccus, n'englobaient pas du tout ces premiers, tout en dévorant énergiquement les staphylocoques. Le nombre de coccus diminuait, et 40 à 50 minutes après l'injection de la première dose, il était déjà impossible d'en trouver dans l'exsudat. On injectait une nouvelle dose de coccus, et on constatait de nouveau leur englobement par des leucocytes, et ainsi jusqu'à la mort de l'animal, qui survenait ordinairement 7 heures après l'injection de la culture de choléra des poules. Des résultats analogues ont été obtenus après l'injection des bacilles du foin, et cela même chez des lapins dans la cavité abdominale desquels on n'avait pas provoqué préalablement de leucocytose artificielle.

En partant de cette conviction que les cultures virulentes de bactéries du choléra des poules, développées sur des milieux artificiels, contiennent beaucoup d'individus non virulents qui subissent la phagocytose, nous avons fait l'expérience suivante.

Nous avons inoculé 1/10e d'une culture virulente sur gélose de bactéries du choléra des poules à un lapin préparé d'avance par l'injection d'eau physiologique. Quatre heures après, quand, à l'examen microscopique de l'exsudat péritonéal, nous ne trouvions presque pas de phagocytose des bactéries nouvellement développées, nous injections de nouveau dans la cavité abdominale 1/5e d'une culture de choléra des poules de 24 heures. Cette dernière culture, ainsi que la première, provenait de l'ensemencement des bactéries prises dans les organes d'un même lapin mort de choléra des poules. Dès 25 minutes après la deuxième injection dans la cavité abdominale, on observait la phagocytose aussi marquée qu'on l'obtient ordinairement dans le premier temps après l'inoculation d'une culture virulente (développée dans un milieu artificiel) à un lapin non préparé préalablement. On a répété encore plusieurs fois des injections pendant toute la durée de la maladie du lapin, et on a pu constater que la phagocytose durait jusqu'à la mort de

l'animal, laquelle est survenue 7 heures après la première injection. Cette expérience a été répétée par nous encore une fois avec les mêmes résultats. Il est évident que ce sont des individus non virulents des cultures virulentes servant à la seconde injection qui subissaient la phagocytose.

On voit dans ces expériences jusqu'à quel point les leucocytes supportent l'action des poisons bactériens. Se trouvant au milieu d'un nombre considérable de bactéries virulentes du choléra des poules, avec lesquels ils sont en contact constant, non seulement ils ne perdent pas leurs propriétés phagocytaires, mais encore ils peuvent choisir entre les bactéries virulentes et non virulentes, avec lesquelles l'animal est infecté.

Il est donc impossible, d'après tout ce qui précède, d'admettre que l'absence du phénomène de phagocytose dans les organes ainsi que dans le sang est la conséquence de l'empoisonnement des leucocytes. Cependant, pour être plus sûr de ce que nous avançons, nous avons injecté dans le sang du lapin infecté avec du choléra des poules, et un peu avant sa mort, d'autres microbes non virulents.

Quelques heures après avoir inoculé sous la peau et dans la cavité abdominale une grande quantité de bactéries virulentes du choléra des poules, on leur injectait dans la veine auriculaire des cultures de staphylocoques non virulents. Un de ces lapins est mort 40 minutes après l'injection de staphylocoques, (4 heures après l'injection du choléra des poules), le second 30 minutes et le troisième 8 minutes après l'injection.

L'étude des organes de ces lapins a montré que les leucocytes englobaient énergiquement des coccus, alors que les bactéries du choléra des poules restaient libres. Comme la troisième expérience, dans laquelle le lapin est mort 8 minutes après l'injection de staphylocoques, est la plus intéressante, nous la noterons en détail.

Trois heures après l'injection, sous la peau et dans la cavité abdominale du lapin, de 1/4 d'une culture sur gélose de bactéries du choléra des poules, nous avons commencé à faire des ponctions du foie avec la pipette. Quand l'examen du sang du foie a montré un grand nombre de bactéries, on a injecté au lapin 7 c. c. d'émulsion de 2 cultures sur gélose de staphylocoques dans l'eau physiologique. L'injection dans la veine

auriculaire a duré 3 minutes et l'animal est mort 5 minutes après l'injection (4 heures 43 minutes après l'injection de bactéries du choléra des poules). Les organes, foie, poumon, rate, ont été examinés sur des frottis ainsi que dans les coupes. Les coupes ont été colorées par la méthode de Gram, suivie de la double coloration par le bleu de méthylène et l'éosine. Cette coloration permettait de distinguer très bien les coccus des bactéries du choléra des poules, car ces derniers ne prennent pas le Gram. Nous avons constaté la phagocytose des coccus dans les trois organes examinés. Le plus grand nombre de coccus a été trouvé dans les poumons ; mais les coupes les plus démonstratives étaient celles du foie. Les bactéries du choléra des poules qui se trouvaient en grand nombre dans le foie restaient libres, alors que la plupart des coccus, dont le nombre était de beaucoup moins considérable, étaient englobés par des leucocytes.

Ainsi, les leucocytes n'ont pas perdu leurs propriétés phagocytaires même au moment de la mort du lapin. En outre, ces propriétés phagocytaires n'ont rien perdu de leur énergie, car en l'espace de 5 à 8 minutes, la plupart des coccus injectés ont été englobés.

Il nous reste encore à noter que les leucocytes des organes du lapin malade de choléra des poules ne perdent pas leur sensibilité chimiotactique vis-à-vis des bactéries de cette infection. Et cela, nous l'avons prouvé par l'expérience suivante.

Nous avons injecté dans la cavité abdominale du lapin 1/8e d'une culture sur gélose de bactéries du choléra des poules. 5 heures après, quand l'examen microscopique a montré un grand nombre de bactéries dans le sang, en l'absence de phagocytose, nous avons injecté dans la veine auriculaire de ce même lapin l'émulsion dans l'eau physiologique de 4 cultures sur gélose de bactéries virulentes du choléra des poules, âgées de 20 heures. Le lapin est mort 15 minutes après l'injection. Nous avons trouvé dans la rate, les poumons et le foie, de nombreuses figures de phagocytose très nette, ce que nous n'avons jamais pu constater dans les organes du lapin mort de choléra des poules dans d'autres conditions. Dans ce cas, les leucocytes ont conservé leurs propriétés phagocytaires, même très peu de temps avant la mort, car ils englobaient les bactéries *non* virulentes, lesquelles étaient injectées avec des bactéries virulentes.

Ce travail nous conduit aux conclusions suivantes :

1. Après l'injection sous la peau ou dans la cavité abdominale du lapin d'une culture virulente sur gélose de bactéries du choléra des poules, on constate l'absence de phagocytose des leucocytes vis-à-vis de bactéries qui se sont déjà développées dans l'organisme.

2. On ne trouve presque pas de phagocytose après l'injection, dans le courant circulatoire du lapin, de bactéries presque exclusivement virulentes (injection d'une culture développée dans l'exsudat péritonéal).

3. Il faut expliquer les phénomènes de phagocytose qu'on trouve lorsqu'on injecte les lapins (sous la peau, dans la cavité abdominale ou dans la veine auriculaire) avec des cultures virulentes de bactéries du choléra des poules, mais qui s'étaient développées dans un milieu artificiel, par la présence dans ces cultures d'individus non virulents parmi les bactéries virulentes.

4. Les leucocytes du lapin, animal très sensible au choléra des poules, ne dévorent pas (quelle que soit le mode d'inoculation) les bactéries virulentes de cette espèce pendant toute la durée de la maladie. Ce fait est un exemple frappant d'absence de phagocytose du côté des leucocytes dans l'infection mortelle.

5. Il faut expliquer l'absence de phagocytose des bactéries virulentes du choléra des poules, non pas par l'empoisonnement des leucocytes, mais par leur sensibilité chimiotactique négative. Les leucocytes du lapin infecté avec des bactéries du choléra des poules conservent jusqu'à la mort de l'animal non seulement la propriété de choisir entre les bactéries virulentes du choléra des poules et les autres microbes non virulents, mais encore ils sont capables de distinguer dans une culture virulente des bactéries non virulentes.

Nous nous faisons un devoir très agréable d'exprimer ici toute notre reconnaissance à M. Metchnikoff, qui nous a ouvert les portes de son laboratoire et prodigué de précieux conseils pendant l'exécution de notre travail.

EXPLICATION DE LA PLANCHE X

Fig. 1. — Coupe du foie du lapin auquel on a injecté dans les veines le liquide péritonéal d'un autre lapin, atteint du choléra des poules. Les microbes sont très virulents : de là, phagocytose nulle.

Fig. 2. — Liquide péritonéal d'un lapin, inoculé dans le péritoine avec du choléra des poules, prélevé sur un animal malade, une heure avant sa mort. Absence de phagocytose.

Fig. 3. — Liquide péritonéal du lapin, quatre heures après l'injection des microbes du choléra des poules dans le péritoine, et 5 minutes après l'injection de cocci non virulents. Les bacilles du choléra des poules sont libres, tandis que les cocci sont englobés par les leucocytes.

Fig. 4. — Liquide péritonéal du lapin, 4 heures après la première injection d'une culture du choléra des poules, 5 minutes après une seconde injection des mêmes microbes. Les microbes sont englobés par les leucocytes.

Fig. 5. — Coupe de foie d'un lapin, mort du choléra des poules : 8 minutes avant la mort on lui a injecté dans la veine une culture de coccus non virulent. Les bactéries du choléra des poules sont libres, tandis que les cocci ont été englobés.

NOTE SUR L'INFLUENCE DES MICROBES
DANS LE DÉVELOPPEMENT DES TÉTARDS

PAR Mme O. METCHNIKOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

On s'est demandé depuis longtemps quel est le rôle des microbes non pathogènes dans le canal intestinal. M. Pasteur supposait qu'ils sont indispensables à la digestion complète des aliments. Mais les premières expériences à ce sujet ne furent faites que beaucoup plus tard par Nuttall et Thierfelder sur des cobayes, et par Schottelius sur des poussins.

Extraits aseptiquement par opération césarienne, élevés et nourris à l'abri des microbes, les cobayes grandirent et augmentèrent de poids, seulement un peu moins que leurs témoins.

Mais les conditions de stérilité absolue étant très difficiles à maintenir pendant longtemps, les cobayes furent sacrifiés après treize jours. On constata leur stérilité parfaite, intérieure et extérieure. Nuttall et Thierfelder conclurent de cette expérience que les mammifères peuvent vivre et utiliser leurs aliments sans le concours des microbes.

Schottelius obtint un résultat diamétralement opposé. Ses poussins, élevés dans des conditions d'asepsie complète, n'augmentaient pas de poids, et tombaient dans un tel état de faiblesse et de maigreur, qu'il dut les sacrifier au bout de dix-sept jours. Eux aussi se montrèrent parfaitement stériles.

Schottelius en déduisit que les microbes sont indispensables à la vie des jeunes oiseaux.

Voici donc deux séries d'expériences, faites avec le plus grand soin, et qui pourtant donnent des résultats opposés.

Ce désaccord peut s'expliquer par la différence de l'action microbienne sur les diverses espèces. Ainsi l'on sait qu'il existe des animaux, par exemple les mites, auxquels les microbes ne sont pas nuisibles, mais au contraire servent d'aliment.

Il se peut aussi que les matières désinfectantes, employées

par Schottelius pour stériliser les œufs, ont pu diminuer la résistance et la vitalité des poussins qui en sortaient.

Enfin la complexité matérielle de ces expériences ne permet pas de les poursuivre assez longtemps.

C'est pourquoi il était nécessaire de tourner la difficulté en s'adressant à un animal dont les conditions d'organisation et de vie permettent de simplifier les manipulations expérimentales.

M. Metchnikoff s'arrêta au têtard de grenouille (*Rana temporaria*), et me chargea d'exécuter l'expérience suivante :

Les œufs de grenouilles sont fécondés extérieurement. On n'a donc pas la ressource de les obtenir stériles dès le début. Mais ils ont une épaisse enveloppe muqueuse qui protège le vitellus et l'embryon du milieu ambiant.

Il s'agit donc de débarrasser l'embryon de son enveloppe impure et de le transporter aseptiquement en milieu stérile.

Le têtard vit dans l'eau et se nourrit de pain. Il est donc très facile de stériliser à 120° un peu de pain dans des ballons et de les remplir ensuite d'eau stérilisée [1].

Il est un peu plus difficile d'obtenir l'embryon à l'état pur.

L'enveloppe muqueuse présente deux couches que facilement on désagrège. La surface de la couche externe est recouverte de microbes et d'algues. Souvent cette flore s'insinue même dans la profondeur et parvient jusqu'à la surface interne de cette couche. Les algues y forment alors un transparent vert.

La couche interne de l'enveloppe muqueuse n'est évidemment pas un bon milieu de culture, soit parce qu'elle est plus imperméable, soit parce qu'elle contient des sucs microbicides, car on n'y observe de végétation qu'aux points de contact avec la couche externe.

Afin d'éliminer autant que possible les microbes superficiels, on rince les œufs dans de l'eau stérilisée, puis on les met sous un courant d'eau, traversant un filtre Chamberland.

On les y laisse jusqu'à ce que l'embryon devienne mobile, ce qui prouve qu'il est prêt à sortir de l'œuf. Alors on transporte les œufs un par un dans des vases d'eau stérilisée, où on les lave encore. Puis, avec des aiguilles flambées, on désagrège les membranes de l'œuf et l'on transporte l'embryon aussi rapide-

1. L'eau ne doit pas être ajoutée avant la stérilisation, car le pain, désagrégé par l'ébullition, troublerait le liquide.

ment que possible, à l'aide de pipettes stérilisées, dans une série consécutive de vases d'eau stérile où on les lave encore. Après cela on les met dans les ballons de culture, et on les y laisse jusqu'à la fin de l'expérience.

Le développement des têtards, stériles ou non, mais nourris exclusivement de pain, était toujours beaucoup plus lent que dans les conditions normales.

Ainsi les plus gros têtards, soit parmi les témoins, soit parmi ceux qui étaient élevés avec du pain, mais dans des vases plus grands que mes ballons et plus librement ouverts, ne présentaient au bout de 80 jours que de tout petits rudiments des pattes postérieures. Dans les conditions normales, la transformation totale est presque accomplie au bout de ce temps.

Cette différence doit, évidemment, tenir à l'espace, à la nourriture et à l'aération.

Mais ceci n'importe point, car seule la comparaison entre les têtards stériles et leurs témoins nous intéresse ici.

Un grand nombre de têtards meurent dès les premières heures ou jours, soit parce qu'ils ont été enlevés de l'œuf avant terme, soit qu'ils ne résistent pas à la culture de microbes, importés avec eux, malgré les précautions prises.

Une autre partie des têtards se montre impure dans un délai plus ou moins long. Ceux-ci serviront de témoins. On obtient cependant des têtards complètement et définitivement stériles. L'eau de leurs ballons reste tout à fait transparente, quoique après quelque temps elle finisse par se troubler si on l'agite. Cela est dû à la macération du pain et aux excréments amassés. Mais les ensemencements faits de temps en temps avec ces derniers et avec l'eau démontrent leur stérilité absolue.

Sur les 80 têtards transportés dans les ballons, 31 moururent dans les premiers jours ; 42 ont donné plus ou moins vite des cultures microbiennes, et 7 seulement sont restés stériles.

Tous, stériles et témoins, ont fini par mourir au plus tard après 79 jours. Mais la mortalité était beaucoup moins forte parmi les têtards stériles.

Ainsi 5 sur 7 de ceux-ci vécurent au delà de 63 jours. Sur les 42 témoins, 7 seulement atteignirent ou dépassèrent ce terme. Évidemment un milieu contenant des déjections, et de plus une flore microbienne avec ses produits, n'est pas favorable à la vie.

Malgré cela les témoins non stériles grandissent et augmentent de poids considérablement plus que les têtards stériles.

Les dimensions et poids individuels des témoins sont assez variables, mais en général très nettement au-dessus de ceux de tous les têtards stériles.

Ainsi la moyenne du poids de ces derniers est de 25 mgr., et celle de leur longueur $15^{mm},5$.

La moyenne du poids des témoins est de 142 mgr., et celle de leur longueur de $26^{mm},5$.

La dimension des têtards témoins est en rapport avec les époques variées de l'apparition des microbes dans leurs cultures. Ainsi ceux qui restèrent stériles pendant

38	jours	et	vécurent	67	jours	avaient	17	m. m.	et pesaient	35 m. gr.
22	—	—		69	—		20	—	—	53 —
19	—	—		67	—		23	—	—	—
17	—	—		67	—		24	—	—	—
1 à 4	—	—	30 à 75		—	26 à 36		—	—	80 à 250 —

Parmi les têtards stériles les plus âgés, celui de

79	jours	avait	15	m. m.	et pesait	25 m. gr.
72	—		16	—	—	—
69	—		17	—	—	35 —
67	—		15	—	—	—
63	—		14	—	—	20 —
46	—		15	—	—	20[1] —

Ainsi le poids et la dimension maxima des têtards stériles correspondent au poids et à la dimension minima des témoins. On peut donc affirmer que les microbes sont nécessaires à la vie et au développement des têtards.

Pour le moment nous sommes obligés de nous borner à ce résultat, car la saison des têtards est passée. Mais il reste à élucider tout le mécanisme de l'influence microbienne, et à apporter bien des améliorations à l'exécution de l'expérience. Tout ceci doit être remis à la prochaine ponte d'œufs de grenouilles.

1. Il n'est pas toujours possible de prendre le poids, car la macération se fait très vite après la mort et le cadavre s'imbibe d'eau

Essai de classification des réflexes non nerveux

Par Jean MASSART

Professeur à l'Université de Bruxelles, assistant à l'Institut botanique.

SOMMAIRE

Page

I. — Généralité des réflexes non nerveux 636
II. — Analyse d'un réflexe non nerveux 637
A. Phases du réflexe 637
B. Durée et intensité des périodes. 639
1. Excitation (et sensation) 639
a). Seuil de durée et seuil d'intensité 640
b). Comble de durée et comble d'intensité 640
c). Rebroussement 640
2. Conduction et réaction 641
a). Temps de latence 642
b). Temps de riposte 642
c). Intensité de la riposte 642
3. Temps de mémoire 642
III. — Nature des excitants 642
A. Excitants internes 643
1. Age 643
2. Forme 644
Excitants non définis 644
a). Influence du sommet 644
b). Polarité 644
c). Arcure 644
B. Excitants externes 645
1. Excitants mécaniques 645
a). Gravitation 645
b). Courant liquide 645
c). Compression 645
d). Contact 645
e). Secousse 646
f). Traction 646
2. Excitants physiques 646
a). Lumière 646
b). Obscurité 646
c). Chaleur 647

Pages

d). Froid 647
e). Ondes hertziennes 647
f). Electricité 647
g). Pression osmotique 647
3. Excitants chimiques 648
Excitants non définis 648
a). Oxygène 648
b). Alcalis et acides 648
c). Narcotiques 649
d). Eau 649
IV. — Nature des réactions 650
A. Réactions préparatives, ou tonus 650
B. Réactions modificatives 653
1. Modifications qualitatives, ou ripostes 655
1° Ripostes formatrices 655
α). Mérisme 656
β). Néisme 656
2° Ripostes motrices 656
a). Déplacements 657
α). Nectisme 657
β). Herpisme 657
γ). Phobisme 658
δ). Protéisme 658
b). Mouvements angulaires 658
1. Ripostes orientées par rapport à l'excitant externe 659
α). Taxisme 659
β). Tropisme 659
γ). Strophisme 659
2. Ripostes orientées par rapport au corps 659
α). Clinisme 659
β). Nastisme 660
γ). Hélicisme 660
3° Ripostes chimiques 660

Pages
4° Ripostes diverses..... 666
α). Photisme..... 666
β). Bolisme..... 666
γ). Sphygmisme..... 666
2. Modifications quantitatives, ou interférences..... 661
1° Interférences subies par les ripostes..... 662
2° Interférences subies par les réactions élémentaires..... 662
α). Chimiose..... 662
β). Thermose..... 662
γ). Electrose..... 662
δ). Péranose..... 663
ε). Synaphose..... 663
ζ). Tonose..... 663
η). Auxose..... 663
Dolichose..... 663
Pachynose..... 664
θ). Morphose..... 664
V. — Direction, sens et localisation des réactions..... 665
A. Orientation par rapport à l'excitant externe..... 665
B. Orientation par rapport au corps..... 667
VI. — Intensité et vitesse des réactions..... 667
VII. — Quelques termes généraux. 668

Tout acte qui se passe dans le protoplasme vivant d'un organisme peut être envisagé au moins sous deux aspects différents : d'une part, on peut considérer dans le phénomène le côté chimique, et étudier les changements matériels qui lui apportent la force nécessaire à son accomplissement, — et d'autre part, on peut l'examiner au point de vue de l'irritabilité, rechercher vis-à-vis de quelle excitation il est une réaction.

Ce second côté de toute question physiologique est presque toujours négligé par ceux qui s'occupent de la partie chimique, comme s'ils oubliaient que rien dans l'être vivant n'est spontané, — que toute modification, si légère soit-elle, a été provoquée par une excitation, et rentre, par conséquent, dans le domaine de l'irritabilité, — en un mot, que tout acte protoplasmique est un réflexe élémentaire, réduit à sa plus grande simplicité.

I. — Généralité des réflexes non nerveux.

Chez les Métazoaires, il existe un appareil particulier qui a pour objet de relier les diverses parties de l'organisme et d'établir ainsi la connexion entre les endroits d'où vient l'excitation et ceux qui doivent produire la réaction. Mais le système nerveux ne régit pas l'irritabilité de toutes les cellules des Métazoaires. Les cellules libres (leucocytes, spermatozoïdes, cellules migratrices du tissu conjonctif) n'ont aucun rapport avec lui. D'ailleurs, il s'en faut de beaucoup que le système nerveux ait la direction générale de tout ce qui a lieu dans les cellules auxquelles il se relie : il ne régit jamais que les actes les plus grossiers (contractions, sécrétions glandulaires, etc.), et il ne renseigne l'animal que sur les modifications les plus brutales du monde extérieur (lumière, son, chocs, etc.) ; tout ce qui est délicat se passe de

son aide : les cellules se divisent, se développent et prennent leurs caractères spécifiques, l'endothélium vasculaire englobe les microbes et les digère, sans que l'appareil nerveux ait à intervenir en quoi que ce soit. Ajoutons que les nerfs n'apparaissent pas chez les animaux dès les premières segmentations de l'œuf ; ainsi, les gastrula d'Échinodermes en sont encore complètement privées, alors qu'elles nagent déjà librement et doivent donc se guider à travers le monde extérieur. En somme, les réflexes nerveux sont l'exception, même chez les animaux supérieurs ; si la plupart des physiologistes leur accordent une préférence si marquée qu'ils ne veulent connaître qu'eux, c'est uniquement parce que leurs effets sont plus apparents. Enfin, à côté des Métazoaires où les réflexes nerveux accaparent d'ordinaire toute l'attention, il y a la foule des organismes inférieurs (Schizophytes, Flagellates, Infusoires, Rhizopodes, etc.) et des végétaux, chez lesquels les réflexes non nerveux existent seuls [1].

Le domaine des réflexes non nerveux, quelque étendu qu'il soit, a pourtant des frontières bien définies. Et l'on se demande pourquoi M. Loeb (1890 et 1891) [2] et son école s'efforcent d'y introduire, par un véritable abus de langage, des choses qui ne ressemblent en rien aux purs et simples phénomènes d'irritabilité. Quel peut bien être l'avantage de désigner par le même mot « tropisme » des réactions aussi distinctes que les déplacements qu'exécutent les Insectes pour se rapprocher de la lumière, et la courbure par laquelle un *Phycomyces* (Champignon) dirige son extrémité vers l'excitant lumineux ? N'est-il pas évident qu'il n'y a rien de commun entre la longue suite d'actes nerveux qui amènent la locomotion de l'Insecte, et les modifications protoplasmiques qui se passent dans le mycélium du Champignon. La science n'a rien à gagner à de pareilles assimilations ; elles reposent sur des confusions volontaires de termes et apportent avec elles la confusion dans les idées.

II. — Analyse d'un réflexe non nerveux.

A. Phases du réflexe. — Un réflexe, même le plus simple, est encore beaucoup plus compliqué qu'il ne le paraissait au premier abord. Dans aucun cas bien étudié, on n'a constaté que les mêmes particules protoplasmiques pouvaient à la fois recevoir l'excitation et manifester la réaction. Ainsi, chez la plupart des organismes unicellu-

1. C'est, à ma connaissance, M. Errera (1894) qui a le premier défini les phénomènes d'irritabilité végétale : *des réflexes sans nerfs.*

2. La bibliographie, rangée par ordre alphabétique, est réunie à la fin de l'article.

laires verts (Flagellates, zoospores d'Algues) la lumière est perçue par le stigma, tandis que c'est par les battements des fouets que l'axe du corps est orienté parallèlement à la lumière; il y a donc eu transmission de l'excitation, depuis le stigma jusqu'aux fouets, par une voie encore inconnue (Engelmann, 1882).

La chose est bien plus complexe, lorsque l'excitation vient de l'intérieur. Prenons, par exemple, le cas suivant : beaucoup de plantes donnent des tiges verticales qui continuent à s'allonger fort longtemps, sans se ramifier, pourvu que le bourgeon terminal soit intact. Dès que le sommet est détruit, les bourgeons axillaires se développent. Le même résultat s'obtient sur une tige encore pourvue de son sommet, mais à laquelle on fait une annélation (c'est-à-dire qu'on lui enlève, sur une hauteur de 1 centimètre environ, tous les tissus superficiels, de façon à ne laisser que le bois) : les bourgeons situés sous l'annélation se mettent aussitôt à pousser. Cette expérience montre que le bourgeon terminal émet une excitation qui empêche la croissance des bourgeons latéraux; dès que l'excitant n'est plus émis (décapitation), ou dès qu'il ne peut plus parvenir aux bourgeons axillaires (annélation), ceux-ci se réveillent tout de suite. — D'autres expériences, dont il serait trop long de donner le détail, indiquent que l'excitation n'arrive pas directement aux bourgeons latéraux, mais qu'elle est reçue d'abord par un organe sensitif, qui transmet ensuite la sensation aux organes capables de produire la réaction. Nous avons donc dans le réflexe inhibiteur que nous venons d'examiner les cinq phases que voici :

Excitation. — Conduction de l'excitation. — Sensation. — Conduction de la sensation. — Réaction.

Dans les cas plus simples, où l'excitation vient du dehors, les deux premiers termes sont supprimés et le réflexe non nerveux ne comprend que trois phases :

... Sensation. — Conduction de la sensation. — Réaction.

Le réflexe, tel que nous venons de l'analyser, est réduit à une trop grande simplicité. En effet, il est certain que chacune des cinq phases comprend encore une infinité de modifications protoplasmiques non perceptibles. La transmission de l'excitation ou de la sensation n'est certes pas une simple conduction physique; sa lenteur fait supposer qu'elle est accompagnée de changements chimiques nombreux, correspondant à autant de petites réactions élémentaires. Nous ne connaissons pas davantage ce qui s'accomplit dans le protoplasme au moment où l'excitation est perçue et devient une sensation, ni la chaîne ininterrompue de modifications qui conduisent plus tard à la réaction finale.

Nous aurons, du reste, à revenir encore plus loin sur cet inextricable écheveau de transformations protoplasmiques. Bornons-nous pour le moment à dire qu'un premier pas a été fait dans la voie de l'analyse intime de ces phénomènes, par M. Czapek (1898) : il a vu que la pointe de la racine, aussitôt après l'excitation, contient une plus grande quantité de substances oxydables aromatiques, tandis qu'il y a diminution des substances qui transportent l'oxygène (zymases oxydantes).

B. Durée et intensité des périodes. — Supposons maintenant un réflexe provoqué par un excitant externe bien maniable, et terminé par une réaction à caractères nets, dont nous pouvons facilement déterminer le commencement et la fin, et mesurer l'intensité. Nous prendrons, par exemple, la courbure qu'exécute la racine sous l'influence de la gravitation ou de la force centrifuge (Czapek, 1895, 1, et 1898), ou bien la courbure d'une tige éclairée d'un seul côté (Wiesner, 1878, 1880).

Faisons remarquer tout d'abord que nous allons *mesurer* la durée et l'intensité. Nous devrons donc subdiviser le réflexe en périodes à limites tranchées, sans plus faire attention aux phases, que nous avions non pas constatées, mais simplement imaginées. Comme nous ne pouvons pas distinguer, *a*) la transmission de l'excitation, *b*) la sensation, et *c*) la transmission de la sensation, nous serons obligé de mesurer en une fois tout le temps qui s'écoule entre la fin de l'excitation et le début apparent de la réaction ; encore ce « temps de latence » comprend-il les premiers changements qui s'accomplissent dans l'appareil réactionnel, avant le moment où la réaction se manifeste à nos sens.

1. *Excitation* (*et sensation*).

Il doit être bien entendu que si nous nous attachons à l'étude de l'excitation, c'est parce que nous ne parvenons pas à atteindre la sensation. En réalité, ce qui intéresse l'organisme, ce qui provoque la réaction, ce n'est pas l'excitation, c'est-à-dire le changement opéré dans le milieu, c'est uniquement le trouble que l'excitant apporte au protoplasme. Mais la sensation se dérobe à nos moyens de recherche, et faute de pouvoir étudier la perturbation protoplasmique, nous sommes bien forcés de nous contenter de ce qui en est la cause immédiate.

Bien rares sont les cas dans lesquels nous pouvons séparer, fût-ce grossièrement, l'excitation et la sensation. En voici un : les Noctiluques (Flagellates), lorsqu'elles s'illuminent dans les vagues et rendent la mer phosphorescente, réagissent non vis-à-vis de l'agitation de l'eau, mais envers la déformation que subit la cellule. La preuve en est que l'émission de lumière se manifeste quand on déforme la cellule doucement, sans la moindre secousse, — alors que tout reste sombre

lorsqu'on fait vibrer fortement le liquide où se trouvent les Flagellates (Massart, 1893).

a). *Seuil de durée et seuil d'intensité.* — Pour que l'excitant agisse, il ne suffit pas qu'il ait certaines qualités sur lesquelles nous reviendrons plus loin, il faut encore qu'il dure un minimum de temps et qu'il ait un minimum d'intensité. On donne à ces valeurs minimales le nom de seuils. Il est essentiel de distinguer le seuil de durée du seuil d'intensité. Une plante qui est exposée un court instant à une lumière, même très forte, ne réagira pas; de même, on a beau soumettre une racine pendant un temps indéfini à une force centrifuge inférieure à 0,001 *g*, rien ne se produit.

b). *Comble de durée et comble d'intensité.* — Existe-t-il un maximum de durée au delà duquel l'excitant cesse d'être efficace, ou un maximum d'intensité que l'on ne peut dépasser sous peine de voir l'excitant rester sans effet? Certes, on constate souvent que des organismes qui ont plusieurs fois de suite, et à de courts intervalles, réagi vis-à-vis d'un excitant déterminé, perdent peu à peu la faculté de réagir; mais il ne faut sans doute incriminer que la fatigue, puisque ces mêmes individus, presque épuisés, réagiront de nouveau si on renforce l'excitation. Ainsi, des Noctiluques qui ont cessé d'émettre de la lumière après un grand nombre de petites secousses, s'illumineront si la secousse est notablement plus forte. Quant au comble d'intensité, il semble que logiquement on doive l'admettre : il en est sans doute des phénomènes d'irritabilité comme de tous les autres actes vitaux : ils ont un *minimum*, un *optimum*, un *maximum* (Errera, 1896). Seulement, la détermination du maximum est rendue difficile, ou même impossible, par ce fait que l'excitant produit encore son effet accoutumé, à une intensité où il est déjà nuisible au protoplasme. Les *Paramaecium* (Infusoires), par exemple, se dirigent encore vers la cathode lorsque déjà leur corps commence à se désagréger sous la force du courant électrique (Ludloff, 1895).

c). *Rebroussement.* — Depuis le seuil d'intensité jusqu'à l'intensité pernicieuse, l'efficacité de l'excitant augmente-t-elle d'une façon continue? On pourrait citer pas mal de faits qui sont en harmonie avec cette idée. Ainsi, le *Polytoma Ulvella* (Flagellate) est très sensible au carbonate de potassium : une solution qui en contient $0^{gr},00691$ 0/0 (5/100,000 de mole) les attire déjà nettement; l'excitation devient de plus en plus forte à mesure que la concentration augmente, jusqu'à ce qu'elle soit telle que l'organisme y meurt instantanément (solution à 10 0/0). Mais d'autres organismes se conduisent d'une façon plus raisonnable : beaucoup d'êtres inférieurs marins (Bactéries, Flagellates, Infusoires), placés dans les solutions hypotoniques par rapport à l'eau de mer, se dirigent vers une solution plus forte; si la

solution devient hypertonique, on les voit aussitôt rebrousser chemin de façon à rester toujours dans une solution qui exerce la même pression osmotique que leur milieu habituel (MASSART, 1891, 1). De même, à une lumière faible, beaucoup de Flagellates verts et de zoospores d'Algues s'orientent avec le bout antérieur vers la lumière; quand l'intensité est forte, ils lui tournent le bout postérieur : les mouvements de natation vont maintenant déterminer la fuite des organismes. Ceux-ci ont donc une tendance à se diriger vers une lumière de force moyenne (STRASBURGER, 1878). Autres exemples : les *Paramaecium* (Infusoires) fuient les températures trop basses et les températures trop hautes (MENDELSSOHN, 1895); les Bactéries aérobies recherchent une tension d'oxygène moyenne. Dans tous ces divers cas, le sens dans lequel se fait la réaction est déterminé par l'intensité de l'excitant : à mesure que celle-ci s'élève, la réaction augmente jusqu'à un certain degré au-delà duquel elle diminue; en un point précis, la réaction fait défaut; dès qu'on l'a dépassé, elle reparaît, mais en sens inverse : il y a eu rebroussement. Contrairement aux exemples précédents, chez le *Volvox* (Flagellate), c'est la durée de l'excitation qui provoque le rebroussement : les individus frais et n'ayant jamais été excités par le courant électrique vont vers la cathode; après un certain temps d'action, ils se retournent et orientent maintenant leur pôle antérieur vers l'anode (CARLGREN, 1899).

On pourrait encore citer quelques autres exemples d'organismes qui sont capables de discerner eux-mêmes l'intensité d'excitant qui leur convient le mieux, et qui cessent de réagir quand ils se trouvent à cette intensité optimale. Toutefois le nombre de ces cas resterait toujours très faible, et nous sommes loin du caractère de généralité que M. VERWORN (1900) attribue à ce phénomène.

2. *Conduction et réaction.*

Les psychologues ont donné le nom de temps de réaction au temps qui s'écoule entre l'excitation et la réaction. Quand il s'agit de réflexes non nerveux, ordinairement plus lents que les manifestations étudiées par les psychologues, on peut souvent distinguer un premier temps pendant lequel rien ne se montre au dehors (*temps de latence*), et un second temps pendant lequel la réaction visible s'accomplit. Comme ce dernier temps n'a de limites précises que pour le genre de réactions que nous distinguerons plus loin sous le nom de riposte, nous l'appellerons *temps de riposte*.

a). *Temps de latence.* — Diverses expériences montrent que le temps de latence est modifié par la durée d'excitation et par l'intensité d'excitation. Les chiffres donnés par M. CZAPEK (1898) pour le géotropisme des racines de Lupin sont tout à fait démonstratifs.

b). *Temps de riposte.* — Il ne semble pas être dépendant de l'excitation qui a provoqué la réaction, mais il est très fortement influencé par tous les excitants qui produisent des *interférences* (voir plus loin) avec la riposte en voie d'exécution.

c). *Intensité de la riposte.* — Elle suit la loi de Weber, bien connue.

3. *Temps de mémoire.*

Il y a encore un dernier temps dont il importe de dire un mot. C'est le temps pendant lequel l'organisme conserve la mémoire d'une sensation envers laquelle il n'a pas pu réagir. Supposons une racine couchée horizontalement; elle va courber sa pointe vers le bas. Mais si la racine est incluse dans du plâtre, cette réaction ne pourra pas s'effectuer. Après une suffisante durée d'excitation, on soustrait la racine, ainsi engypsée, à l'influence directrice de la pesanteur (il suffit de la faire tourner sur un clinostat à axe horizontal). Après quelques heures on libère l'organe tout en le laissant sur le clinostat, et l'on constate que, malgré le temps considérable qui s'est écoulé, la racine a conservé la mémoire de la sensation, puisqu'elle effectue maintenant sa courbure (Czapek, 1898).

III. — Nature des excitants.

Dresser la liste des excitants qui mettent en jeu l'irritabilité des organismes privés des nerfs, c'est en somme dresser la liste de leurs sens. On verra que cette énumération est beaucoup plus longue qu'on ne l'imagine d'ordinaire.

On divise généralement les excitants en internes et externes. Rien n'est plus subtil, dans certains cas, que cette distinction. Lorsqu'un leucocyte est attiré par les substances qui diffusent hors d'une cellule en voie de désorganisation, — lorsqu'il est excité par le contact de l'endothélium des capillaires et qu'il se glisse dans l'interstice des cellules, il réagit vis-à-vis d'excitants qui sont externes pour lui, mais qui sont internes pour l'animal entier. Comment appellera-t-on l'excitant vis-à-vis duquel réagissent les cellules d'un jeune embryon d'Astérie, lorsque, après avoir formé un amas au centre de l'œuf (morula), elles se disposent toutes à la périphérie en une couche unique (blastula), réaction dans laquelle chaque cellule répond à des excitations que lui envoient ses voisines? Il n'y a pas de différence réelle entre ce qui se passe pour les cellules de cet embryon, et ce que nous avons appris à connaître pour les cellules des bourgeons axillaires qui, elles aussi, reçoivent leurs excitations d'autres cellules, même plus éloignées.

Il vaudrait peut-être mieux réserver le nom d'excitants internes à ceux qui, nés dans une cellule, déterminent la sensation et la racétion de la part d'autres organelles de cette même cellule. Ainsi, les contractions rythmiques des organismes unicellulaires, la formation des pseudopodes chez les leucocytes, les mouvements des spermatozoïdes — sont régis, au moins en partie, par des excitants internes vrais. Mais, d'après cette définition, nous n'oserions donner le nom d'excitants internes qu'à ceux-là seuls dont nous constatons les effets dans des êtres unicellulaires, ou bien dans des cellules privées de tout contact, de toute connexion quelconque avec d'autres éléments.

Nous devons donc continuer à suivre l'ancienne définition, et appeler excitants internes tous ceux qui dérivent de l'organisme lui-même et dont la nature nous est inconnue, quitte à les assimiler aux excitants externes au fur et à mesure que, nos connaissances se précisant, nous parviendrons à déterminer leur nature. Ainsi, nous savons que ce sont des substances chimiques qui guident les phagocytes vers les vieilles cellules; pourquoi alors hésiterions-nous à classer cette excitation auprès des autres excitations chimiques? Quelle raison y aurait-il de la laisser dans le « coin des réprouvés », où nous cachons les excitants internes trop peu connus?

***

Encore une remarque, relative à la terminologie. On a l'excellente habitude de désigner par un mot composé le réflexe tout entier. Ainsi, phototaxisme signifie : taxisme provoqué par la lumière; chimiotropisme signifie : tropisme provoqué par une substance chimique. Pour chaque excitant j'indiquerai (*entre parenthèses*) le terme par lequel on pourrait désigner l'excitant dans le mot composé qui représente le réflexe complet. Le plus souvent je n'ai qu'à prendre le mot usuel; parfois, quand il s'agit d'excitants qui n'avaient pas été nommés auparavant, il faudra introduire un terme nouveau.

A. Excitants internes. — Ces excitants sont fort difficiles à classer : nous n'avons pas la plus petite notion sur leur nature réelle. Aussi devons-nous nous contenter de les diviser en deux groupes : le premier comprenant ceux qui dépendent de l'âge; le second, ceux qui dépendent de la forme des organes.

1. *Age* (*Chrono-*). — Beaucoup de phénomènes ne se passent qu'à un certain moment de la vie : ils sont donc provoqués par des excitations qui n'existent qu'à cet âge précis. Souvent, par exemple, la position des feuilles varie avec leur âge; le cas le plus typique est celui de *Yucca* (Webber, 1895) où les feuilles, d'abord dressées s'étalent

progressivement et finissent par diriger leur pointe vers le bas. Un autre exemple caractéristique de l'influence de l'âge est fourni par les vrilles des *Bryonia* et d'autres végétaux grimpants : celles qui n'ont pas saisi de support, et qui n'ont donc pas été excitées du dehors, s'enroulent néanmoins en tire-bouchon dès qu'elles sentent approcher la vieillesse.

2. *Forme* (*Morpho-*). — Toutes les innombrables réactions qui règlent les phases embryonnaires et les positions réciproques des organes sont évidemment provoquées par des excitants internes, dont les uns sont relatifs à l'âge, — les autres, à la forme préexistante. Mais ces choses sont encore trop vagues pour qu'on puisse faire à leur sujet autre chose que des hypothèses. Tout au plus peut-on indiquer quelques excitants internes dont l'origine est plus facile à localiser.

a). *Influence du sommet* (*Acro-*). — Nous avons déjà cité l'action inhibitrice que le sommet de la tige exerce sur les bourgeons axillaires. Un effet analogue se retrouve dans les racines : aussi longtemps que la pointe de la racine principale est intacte, les racines latérales sont horizontales ou obliques (Sachs, 1874); décapite-t-on la racine principale, tout de suite les racines secondaires se courbent vers le bas.

b). *Polarité* (*Polo-*). — Les plantes présentent le plus souvent une polarité telle que chaque portion d'organe, quelque courte qu'elle soit, paraît distinguer son extrémité proximale et son extrémité distale (Vöchting, 1878, 1884, 1892). De quelque façon qu'on oriente des boutures de rameaux de Saule, qu'elles soient mises en terre par le haut ou par le bas, elles produiront toujours les racines les plus vigoureuses au bout proximal (c'est-à-dire celui qui était tourné vers les racines) et les plus forts bourgeons au bout distal. De même, sur des boutures de racines de *Monstera deliciosa* (Aracée), les nouvelles racines se développent près de l'extrémité distale. Dans ces divers cas, l'organe réagit vis-à-vis d'une polarité qui lui est propre.

c). *Arcure* (*Campto-*). — Quand un organe végétal qui s'est courbé, par exemple, sous l'action de la pesanteur, est soustrait à l'excitant avant que l'arcure soit définitivement fixée, on voit que celle-ci s'efface complètement. La portion arquée a donc donné naissance à une excitation envers laquelle l'organe a réagi en se redressant. M. Vöchting (1882) avait donné à ce phénomène le nom de rectipétalité. L'arcure peut avoir aussi des effets plus tardifs. Sur une racine droite, les racines latérales se forment d'une façon égale sur toutes les faces. Quand la racine est arquée, elle émet une excitation inhibitrice qui empêche le développement de toutes les cellules rhizogènes situées sur la face concave (Noll, 1900[1]). Elle produit aussi un excitant qui déter-

1. L'ensemble des expériences faites par M. Noll montre bien qu'il s'agit ici

mine la courbure vers la convexité, des racines nées sur les flancs de la racine arquée.

B. Excitants externes. — Les agents externes qui mettent en jeu l'irritabilité des organismes sans nerfs peuvent être classés en trois groupes : les agents mécaniques, les agents physiques, les agents chimiques.

1. *Excitants mécaniques.*

Ce groupe comprend tous ceux qui, agissant d'une façon directe, tendraient à déplacer l'organisme.

M. Verworn (1900) réunit sous le nom de *barotaxie* toutes les réactions provoquées par une action unilatérale de la pression ; il distingue la thigmotaxie, la rhéotaxie et la géotaxie ; il se base sur l'idée de M. Jensen (1892) d'après laquelle la gravitation, au moins chez les organismes inférieurs aquatiques, agit par les différences de la pression hydrostatique. Cette idée est probablement fausse.

a). *Gravitation* (*Géo-*). — Dans cette rubrique rentre aussi la force centrifuge, qui agit exactement de la même façon que la pesanteur. Ainsi, les racines se courbent vers la terre (elles suivent le sens de la pesanteur) ; elles se courbent aussi vers le dehors du plateau animé d'un mouvement circulaire, c'est-à-dire qu'elles suivent ici aussi le sens de la force. Des recherches récentes ont rendu probable l'idée d'après laquelle la gravitation serait perçue par les cellules, grâce à la pression qu'exerce sur le protoplasme pariétal la chute des grains plus denses contenus dans les cellules (Němec, 1900, et Haberlandt, 1900).

b). *Courant liquide* (*Rhéo-*). — Beaucoup d'organismes sont sensibles aux courants du liquide dans lequel ils se trouvent (Jönsson, 1883, et Stahl, 1884[1]).

c). *Compression* (*Piézo-*). — Une compression générale peut agir comme excitant (Pfeffer, 1893) : la plante s'efforce de croître malgré la résistance qu'elle rencontre et elle exerce alors une pression qui peut s'élever à une douzaine d'atmosphères.

d). *Contact* (*Hapto-*[1]). — Il faut éviter de confondre la compression générale avec la pression nettement localisée, chez laquelle l'excitation est déterminée, non par la pression proprement dite, mais, comme l'a montré M. Pfeffer (1885), par la *différence* de pression que supportent des points voisins : ainsi les racines, qui réagissent vis-à-vis de la

d'une excitation inhibitrice sur les cellules de la face concave et non, comme il l'admet, d'une action favorisante sur les cellules de la face convexe.

1. Il est plus logique de conserver le terme *hapto* qui date de 1884 (Errera), tandis que le terme *thigmo* ne date que de 1889 (Verworn, 2).

compression générale par une énorme augmentation de la croissance, exécutent au contraire vis-à-vis d'un contact une courbure qui les éloigne de l'excitant (Darwin, 1882).

L'excitabilité par contact est très répandue : sous l'action d'un contact, les vrilles des plantes grimpantes se courbent, les Noctiluques s'illuminent, les filaments des *Polyporus* (Champignon) arrêtent leur croissance, les Spirilles s'immobilisent et s'aplatissent contre le corps qu'ils touchent, les leucocytes des Vertébrés poussent leurs pseudopodes vers l'excitant, les spermatozoïdes d'un grand nombre d'animaux et même d'Algues sont guidés dans l'œuf à féconder.

La sensibilité tactile est souvent d'une extrême finesse : le frottement avec un fil pesant 0,00025 milligr. suffit à exciter une vrille de *Sicyos* (Cucurbitacée) (Pfeffer, 1885) ; la minime résistance opposée par la tension de la couche superficielle d'un liquide provoque des réactions tactiles de la part des leucocytes (Massart et Bordet, 1890) et de la part de beaucoup de Bactéries et de Flagellates (Massart, 1890).

e). *Secousse* (*Sio-*). — Bien différente de l'excitation produite par le contact est celle que donne la secousse : les vrilles, qui répondent à un attouchement même très faible, subissent sans la moindre réaction les secousses les plus violentes ; d'autre part, la Sensitive réagit beaucoup mieux à un choc qu'à une pression.

f). *Traction* (*Elco-*). — M. Hegler (v. Pfeffer, 1891) a fait connaître des exemples de plantes qui réagissent vis-à-vis d'une traction : la réaction consiste en un abaissement de la vitesse de croissance en longueur et en une multiplication des éléments résistants (fibres, etc.) que contient l'organe.

2. *Excitants physiques.*

Presque toutes les forces physiques peuvent amener des réactions chez les êtres privés de système nerveux ; il n'y a d'exception que pour le magnétisme et les rayons X.

a). *Lumière* (*Photo-*[1]). — L'excitabilité lumineuse est des plus répandues : elle existe non seulement chez presque tous les êtres pourvus d'une chromophylle, mais en plus chez un grand nombre d'organismes incolores.

b). *Obscurité* (*Scoto-*). — Le plus souvent, l'obscurité ne doit pas, comme excitant, être séparée de la lumière ; elle agit simplement comme absence plus ou moins complète de lumière. Pourtant il y a quelques cas spéciaux où elle agit comme excitant spécial. Ainsi, dans les cellules à plastides vertes des végétaux, les plastides prennent à l'obscurité une position différente de celles qu'elles occupent à la

1. Il paraît préférable d'employer toujours le terme « photo » pour désigner la lumière, que de dire tantôt « photo », tantôt « hélio. ».

lumière, mais les deux positions ne sont pas inverses l'une par rapport à l'autre (Stahl, 1880).

c). *Chaleur* (*Thermo-*). — Cet excitant est encore plus universel que la lumière; il détermine directement de nombreuses ripostes, il exerce une influence très marquée sur l'allure et la marche de presque toutes les réactions, enfin il est indispensable pour mettre le protoplasme en état de réagir[1]. Le plus souvent les réactions sont accélérées à une température moyenne, tandis qu'elles se ralentissent aux températures plus hautes ou plus basses.

d). *Froid* (*Cryo-*). — Il y a pourtant quelques cas dans lesquels le froid n'agit pas simplement comme absence de chaleur, mais où il a une action propre. Ainsi, chez *Stylonychia Mytilus* (Infusoire Hypotriche), les mouvements ciliaires s'accélèrent aussi bien sous l'action du froid (6°) que sous celle de la chaleur (30°); même, pour les cils marginaux, l'excitation par le froid dépasse notablement celle que donne la température de 30° (Pütter, 1900).

e). *Ondulations hertziennes* (*Hertzo-*). — Le *Phycomyces* (Champignon) exécute une courbure qui l'éloigne de la source des vibrations (Hegler, 1891). Les ondulations avaient des longueurs de $0^m,75$ à 2 mètres.

f). *Electricité* (*Electro-*[2]). — Son action sur les végétaux supérieurs est loin d'être suffisamment connue. Quant à son influence sur les organismes inférieurs, elle a été mise en évidence par les travaux de M. Verworn (1889) : beaucoup de Rhizopodes, de Flagellates et d'Infusoires prennent, sous l'influence du courant, une direction définie, soit vers l'anode, soit vers la cathode.

g). *Pression osmotique* (*Tono-*[3]). — Beaucoup d'organismes unicellulaires et de végétaux effectuent des réactions variées qui sont provoquées par la pression osmotique du milieu. Les réactions consistent en des mouvements et en des modifications de la pression intracellulaire. Les êtres inférieurs marins sont le plus souvent excités par les solutions trop fortes comme par les solutions trop faibles (Massart, 1891); chez les plantes, toutes les cellules étudiées ont réagi également vis-à-vis de solutions hypotoniques et vis-à-vis de solutions hypertoniques (Van Rysselberghe, 1899).

Contrairement à l'avis de M. Pfeffer (1888) et de M. Verworn (1900),

1. M. af. Klercker (1891) distingue le thermotropisme (réaction vis-à-vis de la chaleur rayonnante), du caloritropisme (réaction vis-à-vis de la chaleur arrivant par conduction). Il est certain que dans l'organisme, — quelle que soit la façon dont la chaleur est parvenue aux cellules, — elle devient intégralement de la chaleur conduite. Il ne me semble donc pas que la distinction soit justifiée.

2. Il n'y a aucun avantage à conserver les deux termes « électro » et « galvano ».

3. Je ne vois pas l'avantage qu'il y aurait à remplacer le terme ancien « tono », par le terme « osmo » (Rothert, 1901).

l'action excitante des solutions n'est pas due aux propriétés chimiques du corps dissous. On peut se demander avec M. Rothert (1901) si elle ne tiendrait pas à la sortie de l'eau du protoplasme, en d'autres mots, si la sensation qu'éprouvent les cellules quand elles sont baignées par une solution plus forte que la solution habituelle n'est pas celle d'une sortie d'eau à travers le protoplasme; et si, dans les conditions inverses, elles ne sentent pas une pénétration d'eau. Même si la chose était démontrée, si la sensibilité à la concentration devenait un cas particulier de la sensibilité aux échanges d'eau, il faudrait pourtant provisoirement conserver la distinction entre les deux modes d'excitation (Rothert, 1901), jusqu'à ce que l'on puisse, pour tous les excitants, remplacer l'excitation par la sensation.

3. *Excitants chimiques.*

Les excitants chimiques (*Chimio-*), c'est-à-dire ceux où les caractères chimiques des substances sont seules en jeu, — à l'exclusion de leurs propriétés mécaniques ou physiques, — sont probablement les plus importants de tous pour le fonctionnement régulier de l'organisme.

Pour la plupart d'entre eux, nous devons nous contenter d'indiquer la nature chimique de l'excitant, sans pouvoir préciser les détails. Parfois les corps les plus divers, entre lesquels semble n'exister aucun caractère commun, produisent pourtant les mêmes effets; par exemple, les substances qui provoquent l'attraction des Bactéries (Pfeffer, 1888) et celles qui font briller les Noctiluques. Le plus souvent nous ignorons quels sont les corps chimiques qui agissent; ainsi, la division cellulaire chez les Phanérogames blessées se présente avec tous les caractères d'une réaction vis-à-vis de substances chimiques, mais on ignore quelles sont ces substances (Massart, 1898).

Il n'y a que quelques cas dans lesquels une réaction bien définie est provoquée par un seul corps ou par un petit groupe de corps.

a). *Oxygène* (*Aéro-*). — Il donne des réactions très caractéristiques et pour lesquelles il ne peut être remplacé par aucun autre corps. Presque toujours, quand les organismes sont mobiles, ils se dirigent vers l'oxygène, au moins jusqu'à une certaine tension (Engelmann, 1881). Pourtant, M. Rothert (1901) vient de décrire une Bactérie qui fuit l'oxygène à toute concentration.

b). *Alcalis* (*Alcalio-*) *et acides* (*Oxy-*). — Des effets propres aux alcalis n'ont pas été observés souvent. De petites Amibes, qui avaient dans leur milieu habituel la forme de limaces, avec un unique et large pseudopode antérieur, deviennent radiées quand on les transporte dans une solution alcaline (Verworn, 1896). Les *Euglena, Eutreptia* et autres Flagellates voisins contractent leur corps d'une façon caractéristique (voir plus loin, page 658); en outre ils nagent à l'aide de

fouets. Dans un milieu neutre, les deux formes de mouvement coexistent; quand on ajoute au liquide un peu d'alcali, les battements du fouet se ralentissent et cessent bientôt, tandis que les contractions s'exagèrent. Il suffit d'acidifier le liquide pour voir reparaître les mouvements des fouets ; la cellule est alors rigide.

c). *Narcotiques* (*Narco-*). — Ces excitants sont caractérisés, non par leur constitution chimique, mais par la façon dont ils modifient l'irritabilité : tous ces corps ont pour effet d'abaisser notablement la vitesse des réflexes. D'après tout ce que nous savons, leur action se porte sur la sensation; il est donc tout à fait illogique de faire rentrer leurs effets dans la catégorie des « paralysies », comme le fait M. Verworn (1900). D'ailleurs il n'y a pas de différence fondamentale entre un phénomène « d'excitation » et un phénomène de « paralysie ». Ne voyons-nous pas la chaleur accélérer énormément la croissance d'une plante, ou la ralentir jusqu'à l'arrêt complet, simplement d'après le degré de température ? il n'y a pourtant pas là deux excitants différents. De plus, est-ce qu'une excitation affaiblissante n'est pas une excitation au même titre qu'une excitation renforçante ou une excitation inhibitrice? Est-ce que l'affaiblissement, le renforcement, l'arrêt... d'un réflexe en cours d'exécution ne sont pas tous des réflexes qui se manifestent par une modification quantitative de la réaction?

La distinction radicale entre « phénomènes d'excitation » et « phénomènes de paralysie », telle que la fait M. Verworn, n'a donc aucune raison d'être. A notre avis, les narcotiques doivent être rangés dans la catégorie des excitants, tout comme d'autres corps chimiques. S'il n'en était pas ainsi, il faudrait aussi enlever le titre d'excitant à l'oxygène quand il arrête les mouvements de certaines Bactéries anaérobies. Non, tous ces agents sont vraiment des excitants, même quand le réflexe qu'ils provoquent a pour effet final l'affaiblissement ou l'arrêt d'une autre réaction.

d). *Eau* (*Hydro-*). — L'eau est indispensable à l'accomplissement de tous les phénomènes vitaux. Mais à côté de cette influence générale, elle exerce aussi des effets plus spéciaux. A l'état de vapeur, elle provoque des courbures de la part de beaucoup de plantes : les racines des Phanérogames se dirigent vers l'air le plus humide (Sachs, 1872). Pour agir comme excitant, la vapeur ne doit pas nécessairement être répandue d'une façon asymétrique : le degré d'humidité ou de sécheresse de l'atmosphère peut aussi influencer les végétaux, notamment pour l'épaississement de la cuticule (Kohl, 1886). A l'état liquide, l'eau a également des effets très accusés. Une même plante présentera des caractères très différents suivant qu'elle a poussé à l'air humide ou dans l'eau. Parfois même, on verra une feuille allongée (p. ex. *Stratiotes aloides*) avoir des caractères aquatiques dans sa moitié inférieure, plongeant

dans l'eau, et des caractères de plante aérienne dans sa partie émergée. Aucune explication plausible n'a été fournie sur la façon dont la plante sent, dans ce cas, la présence de l'eau.

Il est permis de se demander si, dans ses modes d'action si divers, l'eau doit réellement être toujours rangée dans la catégorie des agents chimiques. Peut-être agit-elle tantôt comme protoxyde d'hydrogène, tantôt comme dissolvant et ionisant, alors que, dans d'autres cas, l'organisme réagit vis-à-vis du courant transpiratoire.

IV. — Nature des réactions.

A. Réactions préparatives, ou tonus. — Tout organisme, par cela même qu'il vit, est le siège d'une activité incessante dont chaque manifestation est une réaction vis-à-vis de quelque excitant. Les réactions grossières et brutales, les seules que l'observation atteigne, ne sont que des modifications de ces réflexes élémentaires, trop délicats et trop fugitifs pour être perceptibles. Mais ils n'en sont pas moins très importants : n'est-ce pas à eux que le protoplasme vivant doit de rester dans cet état de perpétuelle labilité qui est la caractéristique de la vie? Ces réactions sont préparatives, en ce sens que, sans se manifester par aucun effet extérieur, elles sont néanmoins nécessaires pour préparer le protoplasme : elles le mettent en état de répondre à d'autres excitants par des réactions qui, elles, seront visibles.

Un exemple précis fera mieux comprendre de quels phénomènes il est question ici. Une graine sèche ne répond à aucun excitant. Fournissez-lui de l'eau et voilà qu'aussitôt elle est apte à présenter les phénomènes si complexes de la germination; à partir de ce moment elle est devenue excitable par les narcotiques ; toute variation de la température se répercute dans sa vitesse de croissance... Bref, l'eau a tiré la graine de sa rigidité ; elle a préparé le protoplasme à subir les effets d'autres excitants.

Trop peu nombreux, malheureusement, sont les exemples où nous connaissons l'excitant vis-à-vis duquel l'organisme répond par une réaction préparative. Les plus typiques de ces cas ont reçu le nom de *tonus* (p. ex. phototonus); il serait logique d'étendre ce terme à toutes les réactions préparatives, quitte à indiquer que la plupart des tonus sont provoqués par des excitants internes, encore inconnus.

L'hydrotonus qui vient d'être décrit a pour effet de préparer le protoplasme de la graine à recevoir une foule d'excitations. Mais d'ordinaire le tonus est plus spécialisé : il met l'organisme en état de répondre envers un seul excitant ou envers un petit groupe d'excitants. Contentons-nous d'indiquer quelques exemples.

Lorsque deux individus de Sensitive (*Mimosa pudica*) sont placés, l'un à la lumière constante, l'autre à l'obscurité constante, leurs feuilles continuent à présenter pendant plusieurs jours les « mouvements de veille et de sommeil », qu'elles effectuent dans les conditions normales. Mais peu à peu les mouvements deviennent moins étendus, pour s'arrêter bientôt tout à fait. En ce moment, les deux plantes sont dans des états fort différents : celle qui est restée à la lumière a conservé intacte son irritabilité, et il suffit de l'obscurcir un instant pour qu'aussitôt ses feuilles se referment; l'autre au contraire est rigide; elle ne répond à l'excitant lumineux que si on lui rend son irritabilité par une longue exposition à la lumière. Pour que la Sensitive soit en état de répondre par un mouvement à une excitation externe, il faut donc que son protoplasme ait été préparé par un tonus, provoqué par la lumière (phototonus). (Voir notamment Pfeffer, 1875.)

Dans le phototonus de la Sensitive, la lumière agit simplement par son intensité. L'exemple suivant montre une spécialisation plus grande de l'excitant : il ne suffit pas que l'excitant ait l'intensité voulue; il faut encore qu'il influence la plante dans une direction définie.

MM. Schwendener et Krabbe (1892) ont fait voir que très souvent la lumière ne provoque la torsion d'un organe végétal que si cet organe est en même temps soumis à une certaine excitation de la part de la pesanteur. Voici un cas que j'ai eu l'occasion d'étudier. Les branches horizontales de *Russelia sarmentosa* (Scrophulariacée) tordent leurs entrenœuds alternativement à droite et à gauche; cette réaction est provoquée, dans ses traits essentiels, par la lumière unilatérale que perçoivent les feuilles jeunes, ainsi qu'on peut s'en assurer en enlevant les feuilles ou en les enfermant dans un papier d'étain : dans ces conditions, la torsion ne s'effectue pas. Seulement, l'éclairement inégal ne suffit pas à lui seul : jamais un rameau vertical, et éclairé horizontalement, ne présente la moindre torsion : il a donc fallu que la pesanteur, agissant transversalement sur les rameaux, provoquât un géotonus qui met le protoplasme en état de réagir par une torsion vis-à-vis de l'excitant lumineux.

*
* *

Avant de passer aux réactions modificatives, faisons remarquer qu'il n'y a pas de séparation absolue entre elles et les tonus. Ainsi, une certaine dose de chaleur est nécessaire pour qu'une cellule soit prête à recevoir les excitants qui provoquent sa division; mais la chaleur, après avoir fonctionné comme excitant du thermotonus, va maintenant agir comme excitant modificateur, puisque la vitesse avec

laquelle s'effectuera la division de la cellule (temps de riposte) dépend de la température. Comment séparer la chaleur du thermotonus, de la chaleur comme excitant de la réaction modificative? Et dans l'exemple de la Sensitive qui a séjourné à l'obscurité et qui ne redevient sensible à la lumière qu'après une longue exposition à cet agent, à quel moment la lumière cesse-t-elle d'être l'excitant du thermotonus pour devenir l'excitant du mouvement?

B. Réactions modificatives. — Nous avons vu plus haut que les seuls réflexes dont les réactions s'extériorisent par un effet visible sont ceux qui consistent en une modification grossière des réflexes élémentaires. Encore ne connaissons-nous en général que l'excitation qui est au début du réflexe et la manifestation brutale, le coup de théâtre qui le termine; car, comment nous renseigner sur les phénomènes qui se succèdent, depuis le moment où l'excitant tombe au milieu de la pièce compliquée qui se joue dans le protoplasme jusqu'à celui où nous assistons tout à coup au dénouement. Si nous avions nos entrées dans les coulisses, si nous assistions de près à toutes les péripéties de l'intrigue, nous verrions sans doute que les acteurs sont restés les mêmes, et qu'à partir de l'instant où le perturbateur est entré en scène, ils ont simplement modifié leur jeu, — certains d'entre eux gagnant plus d'importance, d'autres passant à l'arrière-plan. De même, la réaction finale d'un réflexe n'est que la suite de changements dans la vitesse et l'intensité des réactions élémentaires. Toutefois, la simplicité des moyens n'exclut pas la variété des résultats : si certaines réactions ne nous apparaissent que sous l'aspect de *modifications quantitatives* de ce qui existait déjà lorsque l'excitant est arrivé, d'autres sont manifestement des *modifications qualitatives*, plus profondes. Or, comme nous ignorons ce qui se passe réellement, nous ne pouvons étudier et classer que les seuls effets apparents des réflexes. Pour la facilité, nous donnerons aux modifications quantitatives le nom d'*interférences*, et aux modifications qualitatives, généralement plus brèves et plus brusques, le nom de *ripostes*. Afin que les noms de ces réactions indiquent à quelle catégorie elles appartiennent, les noms des interférences se termineront en *-ose*, ceux des ripostes, en *-isme*.

Deux exemples feront, mieux qu'une définition toujours boiteuse, saisir la différence qui sépare les deux genres de réactions.

1er *exemple*. — Voici un Infusoire, par exemple un *Vorticella*, en pleine activité; sa vacuole contractile bat avec régularité. Aussi longtemps que les conditions externes restent les mêmes, ses pulsations ont un rythme constant.

a). Mais toute variation de température modifie ce rythme : la chaleur accélère les battements, le froid les ralentit.

b). L'acide carbonique agit aussi comme excitant. Sous son influence, les battements s'espacent toujours davantage, les systoles ne s'effectuent plus que lorsque la vacuole s'est beaucoup agrandie; finalement, la vacuole s'arrête en diastole (Rossbach, 1872).

c). Si la nourriture fait défaut, l'organisme s'encyste. Pendant que le cyste se prépare, les battements de la vacuole deviennent plus lents; l'agrandissement complet ne se fait plus; les systoles surviennent alors que la vacuole est encore toute petite; et bientôt elle s'arrête, en systole, cette fois.

d). Nous pouvons, sans tirer l'organisme encysté de sa torpeur, remettre en activité la vacuole seule; il suffit de déposer le cyste dans une solution saline, par exemple, AzO^3K à 18/100000 mole. Le lendemain, l'Infusoire s'étant adapté à ce milieu, la vacuole a disparu. Une seconde excitation, par une solution à 25/100000 mole, la fait réapparaître (Massart, 1889).

Les diverses réactions que nous venons de citer constituent toutes des modifications purement quantitatives du battement de la vacuole : l'accélération, le ralentissement, l'arrêt, le réveil, sont donc autant d'interférences.

e). Il n'en est plus ainsi pour un phénomène que présente un autre Infusoire, le *Paramaecium Aurelia*. Sous l'action d'une température de 30° à 35°, celui-ci forme tout à coup dans son protoplasme des vacuoles pulsatiles nouvelles, dont le rythme est le même que celui des vacuoles normales (Massart, 1901). — Ici nous avons évidemment affaire à une modification qualitative. Car, quelles que fussent les réflexes élémentaires qui s'effectuaient dans le protoplasme au moment où nous avons appliqué la chaleur, il est certain que la production de vacuoles contractiles est une réaction essentiellement différente de celles qui se produisaient auparavant.

2e *exemple*. — Prenons une tige adulte, dont le péricycle est composé de cellules au repos.

a). Une excitation appropriée provoque, dans les réflexes élémentaires de quelques cellules du péricycle, des changements dont nous ignorons la nature, mais qui se traduisent par la division de ces cellules et par la formation d'un point végétatif de racine : un organe nouveau a pris naissance (modification qualitative, ou riposte).

b). Sous l'influence d'excitants internes et externes, cette racine s'accroît. Supposez à présent qu'elle soit mise horizontalement : la gravitation n'agit plus de la même façon sur toutes les faces, et la racine courbe sa pointe vers la terre. Un organe primitivement droit a subi une courbure; c'est encore une riposte.

c). Pendant que la courbure s'exécute, faisons varier la température : aussitôt nous constatons un changement dans la vitesse avec laquelle se fait la courbure. La modification introduite par l'abaissement ou l'élévation de la température est quantitative ; il y a eu simple interférence de la température avec les facteurs qui étaient en jeu jusqu'alors.

d). Dès que la racine est redevenue verticale, elle recommence à s'allonger vers le bas, d'une croissance régulière et constante, tant que l'activité protoplasmique n'est pas troublée. Mais si nous mettons la racine à la lumière, les diverses réactions qui, par leur combinaison, déterminent l'allongement, se trouveront ralenties; nous créons de nouveau une interférence.

e). Considérons à présent la racine devenue plus âgée. Dans les portions droites, les cellules rhizogènes, qui sont répandues d'une façon symétrique, se développent toutes également et la racine se garnit sur toute sa surface de racines secondaires. Mais sur la face concave de la portion arquée, les excitants qui déterminent le développement des racines sont contrecarrés par des excitants inhibiteurs, et, comme résultat final du conflit, les racines manquent sur la face concave. C'est encore une interférence ; elle a réduit la réaction à tel point que toute manifestation extérieure fait défaut.

***

Comme on le voit, la modification quantitative, ou interférence, consiste en un changement de la vitesse ou de l'intensité avec laquelle s'accomplit une réaction. La modification qualitative, ou riposte, ne diffère peut-être pas de l'interférence par la nature des changements protoplasmiques qui l'amènent, mais le résultat appréciable est tout autre : nous avons ici la création d'une chose neuve qui ne se serait pas produite, même à l'état d'ébauche, si l'excitant n'avait pas agi.

Pourtant, gardons-nous bien de nous faire des illusions sur la valeur réelle de la distinction en interférences et ripostes. Il me suffit que ce groupement constitue un progrès comparativement à ce qui avait été proposé jusqu'ici; mais, de même qu'il faudrait pouvoir substituer la classification des sensations à celle des excitations, de même il n'y aura de progrès définitif que le jour où l'on pourra remplacer la connaissance de réactions extérieures par celle des processus délicats qui se cachent dans le protoplasme. Les mots « interférence » et « riposte » n'ont donc dans mon esprit qu'une signification relative et provisoire.

Comme les ripostes sont mieux étudiées que les interférences, c'est par les premières que nous commencerons.

1. Modifications qualitatives ou ripostes.

La riposte ne peut être caractérisée que par l'effet final, sans qu'il y ait lieu de tenir compte des changements subis par les réactions élémentaires qui s'effectuaient au moment de l'excitation, ni des multiples réactions qui ont dû former une chaîne continue depuis l'excitation jusqu'à ce que l'effet soit devenu visible. Ainsi, nous savons qu'une courbure géotropique est amenée par des modifications unilatérales de la croissance en longueur, et qu'elle est fixée par l'afflux unilatéral de protoplasme et par l'épaississement unilatéral des parois cellulaires ; mais c'est néanmoins la courbure elle-même qui, seule, doit caractériser cette riposte. — Autre exemple. Voici un *Colpidium* (Infusoire) dont la natation calme n'est régie en ce moment que par des excitants internes ; les cils battent d'une façon rythmique et l'organisme suit une ligne hélicoïdale. Tout à coup un excitant externe vient modifier le jeu des cils. L'Infusoire perçoit-il une secousse violente : il va aussitôt renverser le sens des mouvements ciliaires et se jettera brusquement en arrière (phobisme). Si l'excitant est une solution légèrement hypertonique, les battements des cils frontaux s'exagéreront et l'individu s'inclinera vers la face dorsale (clinisme). Enfin, si c'est le courant électrique qui agit, les cils frontaux battront plus fort, mais toujours vers la bouche, tandis que les autres cils battront dans une direction qui sera déterminée par le sens du courant ; finalement l'Infusoire sera orienté parallèlement au courant, avec le bout antérieur vers la cathode (taxisme). — Toutes ces diverses réactions sont produites par des modifications des mouvements ciliaires. Toutefois nous allons les considérer comme autant de réactions différentes.

Les ripostes peuvent être groupées sous quatre rubriques : ripostes formatrices ; ripostes motrices ; ripostes chimiques ; enfin celles qui ne rentrent dans aucune des catégories précédentes.

1° Ripostes formatrices. — Ce sont celles qui donnent naissance à des cellules ou à des organes. Les cellules ou les organes ont toujours une orientation ou une localisation déterminée, par rapport à l'excitant ou par rapport au corps. Dans ce dernier cas c'est aussi, en somme, vis-à-vis d'un excitant interne que les nouvelles cloisons cellulaires s'orientent. Nous savons, par exemple, que dans les spores d'*Equisetum* en germination, la première cloison est toujours perpendiculaire à la direction de la lumière (Stahl, 1885). L'influence directrice de l'excitant est ici évidente ; mais quand on voit sur le point végétatif de

Halopteris (Algue) se former des cloisons longitudinales, d'autres perpendiculaires à l'axe, d'autres faisant avec l'axe un angle défini, et ces diverses cloisons se suivre dans un ordre fixé, peut-on douter que cette régularité soit amenée par des excitants internes?

α). *Mérisme.* — Division de cellules, division d'organelles de la cellule, ou division dichotomique d'organes. La nature réactionnelle de ces divisions n'est pas douteuse; malheureusement nous ne connaissons presque dans aucun cas l'excitant du mérisme.

β). *Néisme.* — Création en un point donné d'organes nouveaux; par exemple, formation de racines sur une bouture, formation de bourgeons sur les blessures des *Fucus* (Algues), naissance de racines sur les tiges de la Cuscute aux points de contact avec l'hôte.

2° Ripostes motrices. — Chez les organismes mobiles, il y a deux sortes de mouvements à considérer : *a*) les déplacements, produits le plus souvent par des cils (et des fouets) ou des pseudopodes, parfois par des contractions protoplasmiques internes; *b*) les mouvements angulaires, résultant d'une modification dans le fonctionnement des cils, des fouets ou des pseudopodes. Les plantes fixées à leur support ne peuvent effectuer que des mouvements angulaires, résultant le plus souvent de modifications de la croissance en longueur.

Il importe d'indiquer avec précision la signification des mouvements angulaires chez les organismes mobiles. L'accumulation des Euglènes (Flagellates) dans les endroits les plus éclairés d'un liquide est due à la collaboration de deux ripostes : un mouvement angulaire qui opère l'orientation des Flagellates vers la lumière et dont l'action cesse dès que ce résultat est atteint (taxisme), puis un mouvement de natation (nectisme) qui les transporte en avant. Le taxisme a donc pour unique effet d'aiguiller les Euglènes dans la bonne direction et de les y maintenir si elles s'en écartent. Quand nous disons : « le phototaxisme amène les Euglènes vers la source lumineuse », nous supprimons sciemment dans notre phrase la seconde réaction; il faut ne jamais oublier que nous faisons cette élision. — Voici un autre exemple. L'accumulation des Bactéries dans un tube capillaire contenant une solution d'extrait de viande est due aussi à deux réactions différentes : la natation (nectisme) amène, par hasard, les Bactéries devant l'orifice du tube, dans la sphère de diffusion de l'extrait de viande; à partir de ce moment, les microbes sont prisonniers dans une trappe, car dès que les mouvements de natation tendent à leur faire faire franchir la limite de la sphère de diffusion, un brusque mouvement de recul les rejette en arrière devant l'entrée du tube (Rothert, 1901); tous les individus finissent par entrer dans le tube; une fois qu'ils y

ont pénétré, la même riposte (phobisme) qui les maintenait dans la zone de diffusion les empêchera maintenant de sortir du tube. Comme on le voit, il n'y a pas ici le moindre taxisme en jeu : à aucun moment il n'y a de mouvement angulaire, et l'accumulation des Bactéries est due uniquement à deux ripostes de déplacement.

a). Déplacements. — Nous ne traiterons que de ceux qui sont produits par des moyens bien connus, laissant de côté les mouvements des Oscillatoriacées, des Beggiatoacées, des Diatomées, des Grégarines, etc.

α). *Nectisme.* — Natation à l'aide de cils ou de fouets, chez les Schizomycètes, les Flagellates, les zoospores de Rhizopodes, d'Algues et de Champignons, les Infusoires, presque tous les spermatozoïdes, et beaucoup de larves très jeunes. Chez les êtres unicellulaires, la natation n'est généralement pas rectiligne : elle se fait suivant une ligne hélicoïdale qui résulte, ou de la façon dont battent les organelles moteurs, ou de la forme du corps.

β). *Herpisme.* — Reptation à l'aide de pseudopodes de forme très variable. Les Rhizopodes, les Flagellates inférieures et certains Sporozoaires, les leucocytes, quelques zoospores et spermatozoïdes présentent ce mode de locomotion. Dans cette rubrique, on peut aussi faire entrer les mouvements protoplasmiques intra-cellulaires : rotation et circulation.

γ). *Phobisme.* — Brusque recul exécuté par beaucoup d'organismes en présence d'excitants « désagréables ». Cette riposte avait été en premier lieu observée chez une Bactérie par M. Engelmann (1882), qui lui donne le nom de *Schreckbewegung*, terme que je traduis par phobisme. M. Jennings (1897 et 1899) a étudié le phobisme chez *Paramaecium Aurelia* (Infusoire) où il est très fréquent : c'est de cette façon que cet Infusoire réagit envers les substances chimiques, les solutions concentrées, la chaleur, la secousse, etc. ; l'auteur confond le phobisme et le taxisme. Tout récemment, M. Rothert (1901) l'a réétudié chez diverses Bactéries ; il ne le sépare pas non plus du taxisme... En réalité, le phobisme est tout différent du taxisme : il est caractérisé par un recul direct, c'est-à-dire par le fait que l'organisme, sans exécuter de rotation autour d'un axe transversal, se met à nager vers le bout qui auparavant était dirigé en arrière.

δ). *Protéisme.* — Raccourcissement, plus ou moins brusque, de l'axe longitudinal (ce qui modifie fortement la forme du corps). Beaucoup d'organismes inférieurs (Grégarines, Flagellates, Infusoires) peuvent contracter leur corps au point que l'axe longitudinal devient plusieurs fois plus court que le diamètre transversal ; en même temps le corps exécute souvent des mouvements en accordéon, notamment

chez les Flagellates (*Euglena*, *Eutreptia*) où ces mouvements ont reçu le nom de métabolisme. Chez certaines formes, la contraction n'est pas symétrique et l'axe du corps se courbe.

On peut faire rentrer dans cette rubrique les mouvements qu'exécutent les pédicelles de beaucoup d'Infusoires Péritriches fixés (*Vorticella*, etc.).

b). Mouvements angulaires. — Ce sont les ripostes qui amènent l'axe du corps tout entier (organismes mobiles) ou l'axe d'un organe (plantes fixées) dans une position qui fait un angle avec la position primitive ; elles ne déterminent jamais aucun transport du corps.

Dans sa nouvelle position, l'axe de l'organe ou de l'organisme est orienté soit par rapport à l'excitant, soit par rapport au corps de l'organisme en question. Ce dernier cas se présente même lorsque l'excitant vient du dehors ; ainsi, les variations de l'éclairage provoquent des courbures dans le pétiole des feuilles d'*Oxalis* et de beaucoup d'autres plantes : les folioles s'écartent ou se rapprochent, c'est-à-dire qu'elles prennent des positions bien définies par rapport au pétiole, mais nullement par rapport à la lumière. — Je puis aussi renvoyer à l'exemple de *Colpidium* (voir p. 656) ; nous avons vu que, sous l'influence d'un excitant externe nettement localisé (solution trop concentrée), l'Infusoire a pourtant effectué une réaction (clinisme) qui n'est pas du tout orientée par rapport à cet excitant.

Nous étudierons séparément les ripostes orientées par l'excitant externe lui-même, et les ripostes dont le sens est défini par le corps, c'est-à-dire par un excitant interne. La différence entre les deux catégories consiste donc dans le fait que, dans la première, l'orientation est visiblement déterminée par l'agent extérieur (géotropisme), tandis que, dans la seconde, elle est en entier sous la dépendance d'excitants externes (exonastisme des fleurs lors de leur épanouissement) ou tout au moins, un excitant interne vient *guider* la riposte qu'a provoquée l'excitant interne (mouvements de « veille et de sommeil » des feuilles).

Dans ce dernier cas, l'agent extérieur n'intervient que par son intensité, tandis que dans les cas où l'excitant externe oriente la riposte, il agit, non seulement par son intensité, mais encore et surtout par sa direction ; par exemple, dans la courbure des filaments aériens de *Phycomyces* (Champignon) vers la lumière.

De même que dans toute classification sincère et naturelle des choses de la vie, nous rencontrons ici des cas embarrassants. Ainsi, nous avons vu plus haut qu'une racine qui vient d'exécuter une courbure tend à se redresser (v. p. 644) ; — et que si la courbure est maintenue, sel racines nées sur les flancs se courbent vers le dehors (v. p. 645). Voilà

des exemples de ripostes dont l'orientation est relative à un excitant d'origine connue ; mais, comme l'orientation est donc relative aussi au corps de la plante, nous rangerons ces ripostes dans la seconde catégorie.

1° Ripostes orientées par rapport a l'excitant externe — Par orientation de l'organe après riposte, nous entendons uniquement la direction de la partie qui perçoit l'excitant externe. Ainsi, quand nous disons qu'une fleur de Pensée se dirige vers la lumière, nous ne considérons que la position finale de la fleur elle-même, en faisant abstraction des directions, souvent fort insolites, qu'affecte le pédicelle.

Au point de vue de l'orientation vis-à-vis de la lumière, les Desmidiacées présentent une particularité très curieuse : elles tournent vers la lumière alternativement les deux bouts (Stahl, 1880).

α). *Taxisme.* — Déviation du corps des organismes unicellulaires et des larves; par exemple électrotaxisme (v. p. 647), phototaxisme (v. p. 653).

β). *Tropisme.* — C'est la courbure bien connue qu'exécutent les organes végétaux, par exemple géotropisme (v. p. 654).

γ). *Strophisme*[1]. — Torsion effectuée par les organes végétaux, par exemple, photostrophisme (v. p. 653).

2° Ripostes orientées par rapport au corps. α). *Clinisme.* — Inclinaison de l'axe du corps, chez les êtres unicellulaires, de telle façon que l'axe fasse un angle avec la direction primitive (Jennings, 1897, 1899, 1900). Dans les cas les mieux connus, le clinisme est déterminé par d'autres cils que le taxisme (Pearl, 1900). Il est donc relativement facile de distinguer les deux ripostes, ce que M. Jennings a négligé de faire. Chez les Flagellates la distinction est plus difficile, puisque ce sont les mêmes fouets qui agissent. Enfin, chez les Amibes et les autres cellules à pseudopodes, il est évidemment impossible de séparer le clinisme, le taxisme et même le phobisme, puisque le corps ne possède à aucun moment un axe défini.

β). *Nastisme*[2]. — Courbure qu'exécutent les organes végétaux sous l'influence d'excitants très variés. Souvent cette riposte est confondue avec les tropismes. Citons notamment les courbures, généralement vers la face ventrale, qu'effectuent beaucoup d'organes horizontaux, par exemple les rameaux rampants de *Lysimachia Nummularia* (Primulacée); les mouvements d'ouverture et de fermeture des fleurs, la

1. MM. Schwendener et Krabbe (1892) appelaient cette riposte « tortisme ». C'est M. Czapek (1898) qui a introduit le terme actuel.

2. Le mot « nastie » a été employé en premier lieu par M. H. de Vries (1872), dans le sens où nous l'employons.

« veille et le sommeil » des feuilles, le redressement d'organes courbés récemment.

γ). *Hélicisme.* — Torsion qui survient chez les organes végétaux, le plus souvent à un âge déterminé ; par exemple, vrilles (v. p. 644), fruit de *Streptocarpus*, etc.

3° Ripostes chimiques. — Il est évident que toute riposte quelconque est accompagnée de changements chimiques; sinon d'où viendrait l'énergie nécessaire? Mais certains réflexes se manifestent uniquement par un phénomène d'ordre chimique; par exemple, la sécrétion de zymases chez un *Drosera* (plante carnivore) qui a capturé un Insecte; la sécrétion d'un acide dans les vacuoles alimentaires d'un Protozoaire (Le Dantec, 1890) : la formation de matières mucilagineuses chez beaucoup d'organismes inférieurs (Klebs, 1886). Il y a sans doute de nombreux autres cas où un corps qui n'existait pas se forme après une excitation appropriée. Mais ces phénomènes sont loin d'être assez connus.

4° Ripostes diverses. — Les organismes inférieurs présentent un certain nombres de ripostes qui ne rentrent dans aucune des catégories précédentes. On peut citer notamment les suivantes :

α). *Photisme.* — Dégagement de lumière sous l'influence d'un excitant, par exemple chez la Noctiluque (Massart, 1893).

β). *Bolisme.* — Expulsion des trichocystes, ou d'autres organelles analogues, chez divers Infusoires (Massart, 1901).

γ). *Sphygmisme.* — Formation de vacuoles contractiles nouvelles, par l'action d'un excitant (Massart, 1901).

2. Modifications quantitatives ou interférences.

Nous avons vu plus haut (p. 654) que le terme « interférence » signifie : toute modification quantitative des réflexes élémentaires qui étaient en train de s'accomplir au moment où l'excitant est arrivé.

Mais il y a encore d'autres modifications quantitatives qui doivent être désignées par le même terme. Ce sont celles qui affectent l'allure (vitesse, intensité et direction) des ripostes que nous avons passées en revue dans le chapitre précédent : une division cellulaire (mérisme), une courbure orientée vers un excitant extérieur (tropisme)... exigent

un temps donné pour leur accomplissement. Or, ce temps peut être très notablement changé suivant que tel ou tel excitant modificateur vient mêler sa propre réaction à celle qui est en cours d'exécution. Ailleurs, c'est l'intensité d'une riposte qui est modifiée. Enfin, dans une riposte à orientation définie, c'est parfois la direction qui se modifie sous l'influence d'une interférence. Comme ce dernier cas est moins connu, je crois utile d'en citer quelques exemples probants.

La position d'une feuille adulte, par exemple de *Fuchsia*, est déterminée par la collaboration, et l'interférence réciproque, d'au moins trois réactions : le phototropisme et le géotropisme qui tendent à donner à la feuille une direction transversale par rapport aux excitants, c'est-à-dire la position horizontale, — le nastisme, dû à des causes internes, qui tend à renverser les feuilles vers le dehors, puis vers le bas. La position d'équilibre de la feuille est donc un compromis entre les diverses réactions : il suffit d'ailleurs de soustraire la plante à l'influence directrice de la lumière et de la gravitation, pour voir les feuilles se réfléchir complètement, présentant en dehors leur face supérieure. Le phototropisme, le géotropisme et le nastisme étaient donc en conflit et interféraient entre eux. — Une tige phototropique dressée qui est exposée à un éclairement horizontal d'intensité moyenne ne se courbe pas horizontalement vers la source de lumière : le géotropisme tend sans cesse à redresser la tige, et la position finale d'équilibre sera oblique (Czapek, 1895, 2).

Dans ces exemples, les divers excitants en jeu produisent tous des ripostes à orientation définie, et la position d'équilibre est intermédiaire entre celles qu'auraient données les divers excitants, agissant isolément. Il n'en est plus ainsi dans les cas suivants : ici l'excitation interférente n'agit que par son intensité et ne peut donc pas, par elle seule, donner une réaction orientée; mais l'absence de direction de l'excitant n'empêche pas une orientation de l'interférence. Les rhizomes souterrains d'*Adoxa Moschatellina* se placent tranversalement par rapport à la pesanteur, c'est-à-dire qu'ils sont horizontaux, aussi longtemps qu'ils sont à l'obscurité. Mais dès qu'ils reçoivent la lumière, le sens de leur géotropisme est modifié et ils courbent leur pointe vers le bas (Stahl, 1884-2). — A la température de 15°-20°, certains *Chromulina* (Flagellates jaunes) montent dans le liquide et s'accumulent dans les couches supérieures. Mais à la température de 5°-7°, leur géotaxisme change de sens, et ils gagnent le fond des récipients (Massart, 1891, 2).

*
* *

On peut classer les interférences en deux groupes, suivant qu'elles modifient les diverses ripostes déjà étudiées, ou qu'elles modifient les réactions élémentaires sans lesquelles la vie n'est pas possible.

1° *Interférences subies par les ripostes.* — Inutile de les décrire en détail : il est évident que toutes les réactions que nous avons étudiées peuvent être modifiées dans leur vitesse et dans leur intensité, à tel point que la riposte peut s'arrêter complètement pour reprendre plus tard, — et qu'en outre les ripostes orientées peuvent être modifiées dans leur direction.

A chaque riposte correspond donc une interférence; celle-ci portera le même nom que la riposte avec remplacement de la terminaison *isme* en *ose*. Ainsi, les variations de température modifient les tropismes (tropose, v. p. 654), le mérisme (mérose), beaucoup d'excitants divers influencent le rythme des vacuoles contractiles (sphygmose, v. p. 653)...

2° *Interférences subies par les réactions élémentaires.* — Il s'agit ici des réactions très complexes sans lesquelles la vie n'est pas possible : on n'imagine pas un être vivant dans lequel ne s'accomplissent pas des phénomènes chimiques continuels, qui n'est pas le siège d'un dégagement de chaleur et d'électricité, dont le protoplasme n'a pas une certaine perméabilité et une certaine cohésion, dont les cellules n'ont pas de pression osmotique, et qui enfin ne possède pas une forme définie; de plus, chez les plantes, il y a toujours quelque portion en voie de croissance ou capable de se remettre à croître. Or, tous les divers complexes de propriétés et de processus qui amènent le dégagement de chaleur, la croissance, la pression osmotique... peuvent subir des modifications quantitatives sous l'influence d'excitants bien connus. De sorte que, tout en ignorant la façon dont les modifications se produisent dans la cellule vivante, nous pouvons définir l'excitant et le résultat final du réflexe. Nous allons passer en revue ces réactions.

α). *Chimiose.* — Les nombreuses interférences réunies dans cette rubrique rentrent déjà partiellement dans la catégorie des interférences subies par les ripostes, par exemple, quand on modifie la vitesse de la sécrétion digestive chez une plante carnivore. Mais les chimioses les plus importantes sont celles qui affectent les phénomènes chimiques fondamentaux du protoplasme. Ne savons-nous pas que l'assimilation du carbone chez les plantes pourvues d'une chromophylle, que les fermentations, que les transformations intimes de substances sont sous la dépendance de multiples excitants?

β) et γ). *Thermose* et *électrose.* — Les modifications dans le dégagement de chaleur et d'électricité sont une suite naturelle des chimioses. Un exemple récent suffira à le montrer : M. Waller (1900) vient d'étudier les variations du potentiel électrique dans les feuilles, suivant l'intensité de l'action lumineuse, donc probablement suivant l'intensité de l'assimilation.

δ). *Péranose.* — Modification de la perméabilité protoplasmique, par exemple sous l'influence de la température (Van Ryssel-berghe, 1901).

ε). *Synaphose.* — Modification de la cohésion du protoplasme. Dans cette rubrique on peut réunir les phénomènes d'agrégation que présentent les cellules végétales, par exemple sous l'influence de la caféine très diluée ; la formation de nombreuses petites vacuoles dans l'endoplasme des Infusoires par l'action de divers excitants ; la désagrégation du protoplasme des Vorticelles soumises à l'éther [1], etc.

ξ). *Tonose.* — Modification de la turgescence (pression osmotique intracellulaire). M. Van Ryssel-berghe (1899) détermine une augmentation ou une diminution de la turgescence en plongeant les cellules dans des solutions plus concentrées ou dans des solutions moins concentrées que celles qui les baignent normalement.

η). *Auxose* [2]. — Modification de la croissance d'un organe ou d'un organisme. Parfois c'est la croissance tout entière, dans les diverses directions de l'espace, qui est influencée; tantôt ce n'est que l'allongement, tantôt ce n'est que l'épaississement. Nous réservons le mot « auxose » aux cas où la croissance générale est altérée; la modification de la croissance en longueur s'appellera *dolichose* [1], et la modification de la croissance en épaisseur, *pachynose.* Citons un exemple de chacun de ces cas.

Auxose proprement dite. — L'Ortie a des feuilles opposées; les deux feuilles de chaque paire sont égales. Il en est de même pour des plantes voisines de l'Ortie, par exemple pour le *Pilea trinervia.* Mais ici les feuilles de chaque paire ne sont semblables que sur les rameaux verticaux; dès que les rameaux sont obliques ou à direction horizontale, les feuilles deviennent inégales : celles qui sont dirigées vers le haut deviennent plus petites; celles qui regardent la terre deviennent plus grandes; seules, celles qui se dirigent latéralement ont dans toutes leurs parties les mêmes dimensions que les feuilles des rameaux verticaux. La pesanteur a donc affaibli la croissance générale des feuilles qui montent, et elle a renforcé la croissance des feuilles qui descendent.

Dolichose [3]. — M. Elfving (1880) et M. Schwarz (1881) ont montré que l'allongement est retardé quand la plante croît avec la tête en bas.

1. Sur ce point paraîtra bientôt un travail de Mlle Stefanofska.

2. Ne pas confondre « auxose » avec « auxèse », terme proposé par M. Czapek (1898), pour désigner la formation d'organes nouveaux, ce que j'appelle « néisme » (v. p. 656) ou la croissance d'organes latéraux. Au point de vue étymologique, le terme « auxèse » ne convient pas pour désigner la création d'organes.

3. M. Czapek (1898) n'emploie le mot « dolichose » que pour désigner l'augmentation de la croissance en longueur, tandis que la diminution s'appelle « stase ».

D'autre part, nous savons que la lumière, quelle que soit sa direction, ralentit aussi la croissance.

Pachynose. — L'épaississement des crochets irritables que possèdent certaines lianes est beaucoup plus intense lorsque le crochet a été excité par le contact, que lorsqu'il n'a pas eu l'occasion de saisir un support (Treub, 1883).

θ). *Morphose*[1]. — Modification de la forme et de la structure, principalement chez les végétaux. — La forme d'une plante adulte est le résultat de la superposition d'innombrables réactions : en certains points les cellules se divisent activement, soit au sommet, soit à la base, soit au pourtour des organes; — ceux-ci s'allongent, puis s'arrêtent, puis se remettent à croître; les uns s'accroissent en épaisseur, tandis que les autres gardent éternellement leur diamètre initial; — des organes nouveaux naissent en des endroits déterminés; ailleurs les organes tombent après avoir fait leur temps; — certaines portions doivent leur rigidité à leur turgescence; d'autres possèdent des éléments résistants spéciaux; — les tiges, les racines, les feuilles, les fleurs, les fruits exécutent les courbures et les torsions les plus variées sous l'action d'une foule d'excitants internes et externes... Et pour changer l'aspect extérieur et même la structure intime de cet édifice si compliqué, pour la construction duquel tant de réflexes ont dû collaborer, il suffit de faire agir un nouvel excitant ou d'enlever un seul des excitants habituels. Placez la plante à l'obscurité, aussitôt tous ses organes aériens deviennent méconnaissables. Mieux encore, soumettez-la à un éclairement continu; en d'autres mots, soustrayez-la aux alternatives d'obscurité et de lumière, et sa structure se modifie également d'une façon profonde (Bonnier, 1895). Disposez une jeune plante de *Ranunculus aquatilis* de telle manière que certaines feuilles se développent dans l'eau, et d'autres dans l'air humide, et vous constatez que les premières sont découpées en lanières filiformes, qu'elles n'ont pas de stomates et que leurs cellules épidermiques possèdent des chloroplastes, tandis que les feuilles aériennes ont des segments beaucoup plus larges, aplatis, avec une face supérieure et une face inférieure bien distinctes; elles ont des stomates, et leurs cellules épidermiques sont dépourvues de chloroplastes (Askenasy, 1870).

Nous n'essaierons pas d'analyser les interférences si complexes qui conduisent aux changements de forme. Du reste, ce chapitre de la physiologie a été à peine effleuré jusqu'à présent.

1. La modification de la forme des végétaux sous l'action de causes externes a été appelée par Sachs (1895) « méchanomorphose ». Notre terme « morphose » embrasse toutes les modifications, quelle que soit l'origine des excitants.

V. — Direction, sens et localisation des réactions.

Il ne nous reste plus guère qu'à proposer un complément de terminologie. Les questions de termes ne sont pas sans importance : les progrès d'une science dépendent, bien plus qu'on ne le croit, de l'existence d'une terminologie claire, précise, logique et uniforme. Or ce sont là des points dont les auteurs semblent n'avoir pas tenu compte dans ces noms qui désignent les réflexes sans nerfs.

A. Orientation par rapport a l'excitant externe. — D'habitude le mot composé qui désigne le réflexe comprend aussi le sens dans lequel la riposte s'effectue. Ainsi, les racines sont dites prosgéotropiques ou positivement géotropiques, parce qu'elles se dirigent vers la source de l'excitant (la terre) : les tiges sont dites apogéotropiques ou négativement géotropiques parce qu'elles s'éloignent de la terre. Il est évident tout d'abord que positif et négatif ne signifient rien. Quant aux mots « pros [1] » et « apo [2] », leur choix est tout à fait arbitraire. En effet, au lieu de considérer le géotropisme d'une plante, voyons comment les choses se présentent pour le rhéotaxisme d'un Infusoire (orientation du corps sous l'influence d'un courant liquide). D'après la terminologie usuelle, il faudra dire prosrhéotaxique quand l'organisme se dirige vers la source de l'excitant et aporhéotaxique quand il s'en éloigne. Lorsque l'écoulement de l'eau est produit par la pression d'un piston sur la surface du liquide, les individus qui remontent le courant seront dits prosrhéotaxiques. Mais dans la nature, les courants liquides sont déterminés par la pesanteur; dans un ruisseau, par exemple, la cause du mouvement étant l'attraction de la terre, il faudrait, en bonne logique, nommer prosrhéotaxique l'organisme qui descend le courant. Et comment dira-t-on pour l'Infusoire qui résiste au courant produit dans le liquide par les battements ciliaires d'un Rotifère? Il y a dans ce cas deux courants : l'un qui est dirigé vers le Rotifère, l'autre qui s'en éloigne; suivant que l'Infusoire sera en avant ou en arrière de son ennemi, il sera pros- ou aporhéotaxique. Il serait certes plus logique de désigner l'orientation par la direction de l'organisme relativement au sens du courant et de dire rhéotaxisme *ascendant* ou *anarhéotaxisme*, et rhéotaxisme *descendant* ou *catarhéotaxisme* [3].

La même règle peut s'appliquer à tous les courants réels ou fictifs.

1. Le mot « pros » a été introduit par M. Rothert (1896).
2. Le mot « apo » a été introduit par Darwin (1882).
3. Les mots *ana-* et *cata-* sont usités dans le même sens, en électricité.

Voyons d'abord les excitants mécaniques à direction définie et laissant à l'organisme la liberté de ses mouvements : gravitation, courant liquide, contact. On appellerait *cata-* toute réaction dans laquelle l'organisme ou l'organe suit la direction que tend à lui imprimer l'agent extérieur : la racine serait dite catagéotropique, — les Infusoires qui remontent le courant, anarhéotaxiques, — la racine dont la pointe s'éloigne de l'objet qui la touche, cathaptotropique. On pourrait dire aussi géotropisme descendant, rhéotaxisme ascendant, haptotropisme descendant.

Le sens des excitants physiques et chimiques est comparable à un déplacement. Tout corps dissous diffuse et donne donc lieu à un véritable déplacement de matière. Ici encore nous dirions que la réaction est descendante ou ascendante, *cata-* ou *ana-*, selon que l'organisme va dans le même sens que le courant de diffusion ou qu'il se dirige vers les endroits où la concentration est maximum : d'après cette règle, la plupart des organismes d'eau douce sont catatonotaxiques, puisqu'ils fuient les solutions concentrées, et les Bactéries qui se dirigent vers l'extrait de viande sont, pour cette substance, anachimiotaxiques.

Enfin, la lumière, la chaleur, l'électricité, les ondes de Hertz, sont aussi des mouvements vibratoires qui se déplacent; nous désignerons encore par les termes *cata-* et *ana-* les réactions dans lesquelles l'organisme se déplace dans le même sens que les ondulations, et celles dans lesquelles il va en sens inverse : le *Phycomyces* est anaphototropique, catathermotropique et cataherzotropique; le *Paramaecium Aurelia* est catélectrotaxique.

Pour les réactions qui ne s'orientent pas parallèlement à la direction des excitants, il n'y a aucune difficulté. Les botanistes sont d'accord pour appeler *transversale* (*dia-*) la réaction dans laquelle l'organe prend une direction perpendiculaire à l'excitant, et *para-*, la position de profil (par exemple les feuilles de l'*Eucalyptus Globulus* adulte). On pourrait y ajouter *plagio-*, pour la direction oblique, par exemple la tige des plantes volubles.

B. Orientation par rapport au corps. — Contentons-nous d'indiquer les principes qui pourraient servir de guide pour désigner ces orientations.

Le choix des termes adoptés ne me paraît pas heureux. Alors que les courbures tropiques sont définies par le sens de la riposte, les courbures nastiques sont définies par la face qui s'accroît le plus; ainsi, on appelle épinastique un organe qui se dirige vers le bas. Mieux vaudrait renoncer aux mots épi et hypo, qui pourraient amener des confusions avec le géotropisme et désigner les nastismes par le sens vers lequel l'organe se courbe : le mouvement d'épanouissement des fleurs et l'étalement des feuilles s'appellerait *exonastisme;* le mou-

vement inverse, *endonastisme ;* la courbure d'une tige rampante vers sa face ventrale (inférieure), *gastronastisme* (par exemple chez *Lysimachia Nummularia*) : la courbure des racines secondaires nées sur une racine arquée, vers la face convexe (v. p. 654), *cyrtonastisme ;* le redressement des organes courbés récemment, *orthonastisme.*

Les clinismes étudiés chez les Infusoires pourraient être désignés par ces mots : *noto-*, *gastro-*, *dextro-*, *lévoclinisme*, selon que l'individu se retourne vers la face dorsale, vers la face ventrale, vers son bord droit ou vers son bord gauche.

VI. — Intensité et vitesse des réactions.

La terminologie dont nous avons indiqué les bases dans le chapitre précédent s'applique particulièrement aux ripostes. Nous avons à voir maintenant comment on peut nommer les variations d'intensité et de vitesse des interférences. Il serait utile d'indiquer le sens de la variation par un infixe ajouté au mot composé qui représente le réflexe total.

Quand l'interférence consiste en un amoindrissement de la réaction d'une façon générale, on pourrait dire *mio ;* si l'amoindrissement est un ralentissement, *brady ;* si c'est un affaiblissement de l'intensité de la réaction, *oligo.*

Quand l'interférence consiste en un agrandissement de la réaction d'une façon générale, on pourrait dire *plio ;* si l'agrandissement est une accélération, *tachy ;* si c'est un renforcement de l'intensité de la réaction, *cratéro.*

Parfois l'amoindrissement de la réaction est tel que la réaction s'arrête. Nous en avons vu des exemples dans l'influence inhibitrice du sommet sur la croissance des bourgeons axillaires (v. p. 6) et dans l'arrêt qui frappe les cellules rhizogènes sur la face concave d'une racine arquée (v. p. 638). Nous savons aussi que le nectisme des *Bacterium photometricum* s'arrête au moment où on les place à l'obscurité (Engelmann, 1882). Ces arrêts peuvent être désignés par *pausi.*

D'autre part, la vacuole contractile d'un Infusoire encysté se remet à battre sous l'action d'une solution saline (v. p. 653).

Tout réveil analogue serait indiqué par *égiro.* Comme dans le cas que nous venons de citer, la solution agit par sa pression osmotique, nous appellerons le réflexe : tonégirosphygmose.

Dans certains cas, la croissance subit une modification très curieuse : il se produit un véritable phénomène de balancement. Nous en connaissons déjà un exemple : les *Pilea* (v. p. 663) chez lesquels les rameaux horizontaux portent vers le haut des feuilles plus petites que celles des rameaux verticaux, — et vers le bas, des feuilles plus

grandes, — tandis que les feuilles qui sont dans le plan du rameau ont les mêmes dimensions que sur les tiges dressées. M. Wiesner (1868) qui s'est beaucoup occupé de ce phénomène lui a donné le nom d'anisophyllie. C'est aussi à M. Wiesner que nous devons la connaissance de balancements dans la croissance en épaisseur: les branches horizontales du Tilleul (*Tilia*) ont les couches annuelles plus épaisses vers le haut que vers le bas (*épitrophie*) ; chez l'If (*Taxus*), c'est le contraire (*hypotrophie*). Ces deux termes[1] viennent de M. Wiesner (1889). En réalité, il n'y a pas de différence fondamentale entre le balancement de la croissance générale des feuilles, et le balancement de la croissance en épaisseur des branches ; le premier est une auxose, le second une pachymose ; il serait logique de désigner le phénomène de balancement par *aniso*.

A l'encontre de ce qui se passe pour les autres interférences, cette réaction-ci est orientée. On pourrait désigner l'orientation par la direction dans laquelle l'accroissement est prépondérant. Ainsi, l'inégal développement des feuilles de *Pilea* (sous l'action de la pesanteur) s'appellerait géanisauxose descendante, et le même phénomène pour l'épaississement du Tilleul s'appellerait géanisopachynose ascendante.

VII. — Quelques termes généraux.

Il est toujours fort désagréable d'avoir à employer une longue périphrase pour exprimer une idée, surtout lorsque cette périphrase doit revenir souvent. Aussi me permettrai-je de proposer quelques termes qui n'ont d'autre but que de remplacer chacun une périphrase.

Oxynésie : la faculté de l'organisme de produire une excitation.

Esthésie[2] : la faculté de l'organisme de sentir une excitation. Ce terme est à subdiviser en *autesthésie*, sensibilité avec excitants internes (par exemple camptesthésie, sensibilité à l'arcure), et *cosmesthésie* sensibilité aux excitants externes (par exemple thermesthésie, sensibilité à la chaleur).

Tonésie : faculté de l'organisme de manifester un tonus.
Ergésie. — — — une riposte.
Allésie. — — — une interférence.

Les mots que je viens de signaler se rapportent aux propriétés de l'organisme. Mais il serait également utile d'avoir des mots pour exprimer la faculté que possède l'excitant de provoquer telle ou telle

1. Ils ne me semblent pas heureux : en effet le phénomène nutritif n'est pas ici à l'avant-plan.

2. Ce terme a été déjà proposé par M. Czapek (1898).

réaction. On pourrait former ces mots en *-agogue*. Ainsi, la lumière est tonésagogue quand elle donne à la Sensitive le tonus nécessaire; elle est taxagogue ou tropagogue quand elle provoque un taxisme ou un tropisme; elle est auxotagogue, quand elle modifie la croissance...

Sit venia verbis.

BIBLIOGRAPHIE

1891. — J. af Klercker, Ueber caloritropische Erscheinungen bei einigen Keimwurzeln. *Ofversigt af Kongl. Vet.-Akad. Forhandl.*, nº 10, Stockholm.

1870. — E. Askenasy, Ueber den Einfluss des Wachsthumsmediums auf die Gestalt der Pflanzen. *Bot. Zeit.*, 1870, S. 193.

1895. — G. Bonnier, Influence de la lumière électrique continue sur la forme et la structure des plantes. *Rev. gén. Bot.* T. VII, p. 241.

1895. 1. — Fr. Czapek, Untersuchungen über Geotropismus. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd 27, S. 243.

1895. 2. — Ueber Zusammenwirken von Heliotropismus und Geotropismus. *Sitzungsb. Kais. Akad. Wiss. Wien. Math.-nat. Classe.* Bd CIV, Abth. I. März, 1895.

1898. — Weitere Beiträge zur Kenntniss der geotropischen Reizbewegungen. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd 22, S. 175.

1882. — Ch. Darwin, *La Faculté motrice dans les plantes.* Trad. franç.

1872. — H. de Vries, Ueber einige Ursachen der Richtung bilateralsymmetrischer Pflanzentheile. *Arb. d. bot. Inst. zu Würzburg*, Bd I, S. 223.

1891. — E. de Wildeman, Recherches sur l'influence de la température sur la marche, la durée et la fréquence des caryocinèses dans le règne végétal. *Ann. Soc. belge. microsc.* (*Mémoires*). T. XV, p. 5.

1880. — Fr. Elfving, Beitrag zur Kenntniss der physiolog. Einwirkung der Schwerkraft auf die Pflanzen. *Acta. Soc. Fenn.* T. XII. (Cité d'après Czapek, 1898.)

1881. — W. Engelmann, Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung. *Bot. Zeit.* 1881, S. 441.

1882. — Bacterium photometricum. *Pflüger's Archiv.* Bd 30.

1888. — W. Engelmann, Die Purpurbacterien und ihre Beziehung zum Licht. *Bot Zeit.*, 1888.

1884. — L. Errera, Die grosse Wachsthumsperiode bei den Fruchtträgern von Phycomyces. *Bot. Zeit.*, 1884, S. 497.

1894. — La pointe de la racine. *Bull. Soc. roy. bot. Belg.* T. XXXIII, 2e partie, p. 87.

1896. — Essais de philosophie botanique. — I. L'Optimum, *Rev. Univ. Brux.* T. I.

1900. — G. Haberlandt. Ueber die Perception des geotropischen Reizes. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.* Bd 18, S. 261.

1891. — R. Hegler, Ueber die physiologische Wirkung der Hertz'schen Elektricitätswellen auf Pflanzen. *Verh. d. Ges. deutscher Naturf. u. Aerzte, Halle*. 1891.

1897. — H. S. Jennings, Studies on the reactions to stimuli in unicellular organisms. I. Reactions to chemical, osmotic and mechanical stimuli in the ciliate Infusoria. *Journal of Physiology*, vol. XXI.

1899. — Studies, etc. II. The mechanism of the motor reactions of Paramaecium. *Am. Journal of Physiol.*, vol. II.

1900. — Studies, etc. V. On the movements and motor reflexes of the Flagellata and Ciliata. *Am. Journal of Physiol.*, vol. III.

1892. — P. Jensen, Ueber den Geotropismus niederer Organismen. *Pflüger's Archiv*. Bd LIII.

1883. — B. Jönsson, Der richtende Einfluss strömenden Wassers auf wachsende Pflanzen und Pflanzentheile (Rheotropismus). *Berd. deutsch. bot. Ges.* Bd I. S. 512.

1886. — G. Klebs, Ueber die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. *Arb. a. d. bot. Inst. zu Tübingen*. Bd II, S. 333.

1886. — F. G. Kohl, *Die Transpiration der Pflanzen*, Braunschweig, H. Bruhn, 1886.

1890. — F. Le Dantec, Recherches sur la digestion intracellulaire chez les Protozaires. *Ann. Inst. Past.* Vol. IV, p. 776.

1890. — J. Loeb, *Der Heliotropismus der Thiere und seine Uebereinstimmung mit dem Heliotropismus der Pflanzen*. Würzburg, 1890.

1891. — Ueber Geotropismus bei Thieren. *Pflüger's Archiv*. Bd XLIX, S. 175.

1890. — J. Massart et Ch. Bordet, Recherches sur l'irritabilité des leucocytes, *Journal de la Soc. roy. Sciences méd. et nat.* Bruxelles, février 1890.

1889. — J. Massart, Sensibilité et adaptation des organismes à la concentration des solutions salines. *Arch. de Biologie*, t. IX.

1890. — La sensibilité tactile chez les organismes inférieurs. *Journ. Soc. roy. Sc. méd. et nat.* Bruxelles, 1er décembre 1890.

1891. 1. — Recherches sur les organismes inférieurs. — II. La sensibilité à la concentration chez les êtres unicellulaires marins. *Bull. Acad. roy. Sc. Belg.* (3), t. XXII, p. 148.

1891. 2. — Recherches, etc. — III. La sensibilité à la gravitation. *Ibidem*.

1893. — Sur l'irritabilité des Noctiluques. *Bull. scient. France et Belg.*, t. XXV, p. 59.

1898. — J. Massart, La cicatrisation chez les végétaux. *Mém. cour. Acad. roy. Belgique*, t. LVII.

1901. — Le lancement des trichocystes chez Paramaecium aurelia. *Bull. Acad. roy. Belg. (Cl. d. Sc.)*, nº 2, p. 91, 1901.

8095. — Mendelssohn, Ueber den Thermotropismus einzelliger Organismen. *Pflüger's Archiv*, Bd LX.

1900. — B. Němec, Ueber die Art der Wahrnehmung der Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, Bd 18, S. 241.

1900. — Fr. Noll, Ueber den bestimmenden Einfluss von Würzelkrüm-

mungen auf Entstehung und Anordnung von Seitenwurzeln. *Landwirthsch. Jahrb.*, 1900.

1900. — R. Pearl, On the reactions of certain Infusoria to the electric current. *Am. Journ. Physiol.*, vol. IV, p. 96.

1875. — W. Pfeffer, *Die periodische Bewegungen der Blattorgane.*

1884. — Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. *Unters a. d. bot. Institut zu Tübingen*, Bd I.

1885. — Zur Kenntniss der Contactreize. *Unters. a. d. bot. Institut zu Tübingen*, Bd I, S. 483.

1888. — Ueber chemotactische Bewegungen von Bacterien, Flagellaten und Volvocineen. *Unters a. d. bot. Institut zu Tübingen*, Bd II.

1891. — Mittheilungen über Versuche Hegler's « Ueber den Einfluss von Zugkräften auf Pflanzen ». *Sitzb. d. Sächs. Gesellsch. d. Wissensch.*, 1891, S. 638.

1893. — Druck- und Arbeitsleistung durch wachsende Pflanzen. *Abh. math.-phys. Classe d. Kön. Sächs. Ges. d. Wissensch*, Bd XX, S. 235.

1900. — A. Pütter, Studien über Thigmotaxis bei Protisten. *Arch. f. Anat. u. Physiol.* Phys. Abth. Supplementband, S. 243.

1872. — M. J. Rossbach, Die rhythmischen Bewegungserscheinungen der einfachsten Organismen und ihr Verhalten gegen physikalischen Agentien und Arzneimittel. *Verh. d. physik.-medic. Ges. Würzburg.* N.-F., Bd II, S. 179.

1896. — W. Rothert, Ueber Heliotropismus. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, Bd VII, S. 1.

1901. — Beobachtungen und Betrachtungen über tactische Reizerscheinungen. *Flora*, Bd. 88, S. 371.

1872. — J. Sachs, Ablenkung der Wurzel von ihrer normalen Wachsthums. richtung durch feuchte Körper. *Arb. d.b ot. Inst. zu Würzburg*, Bd I, S. 209.

1873-1874. — Ueber das Wachsthum der Haupt-und Nebenwurzeln. *Ibidem*, S. 385 und 584.

1894. — Physiologische Notizen. VIII. Mechanomorphose und Phylogenie *Flora*, Bd 78 S. 275.

1881. — Fr. Schwarz, Der Einfluss der Schwerkraft auf das Längenwachsthum des Pflanzen. *Unt. a. d. bot. Inst. zu Tübingen*, Bd I, S. 53.

1892. — S. Schwendener und G. Krabbe, Untersuchungen über die Orientrungstorsionen der Blätter und Blüthen. *Abh. d. k. preuss. Akad. d. Wissensch.* 1892.

1880. — E. Stahl, Ueber den Einfluss von Richtung and Stärke der Beleuchtung auf einige Bewegungserscheinungen im Pflanzenreiche. *Bot. Zeit.*, 1880, S. 393.

1884, 1. — E. Stahl, Zur Biologie der Myxomyceten. *Bot. Zeit.*, S. 145.

1884, 2. — Einfluss des Lichtes auf den Geotropismus einiger Pflanzenorgane. *Ber. d. deutsche bot. Ges.*, Bd II, S. 383.

1885. — Einfluss der Beleuchtungsrichtung auf die Theilung der Equisetumsporen. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, Bd III, S. 334.

1878. — E. Strasburger, Einfluss des Lichtes und der Wärme auf Schwarmsporen. *Jenais che Zeitschrift f. Naturf.* Bd XII.

1883. — M. Treub, Sur une nouvelle catégorie de plantes grimpantes *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg*, T. III, p. 44.

1899. — Fr. Van Rysselberghe, Réaction osmotique des cellules végétales à la concentration du milieu. *Mém. cour. Acad. roy. Belg.*, t. LVIII.

1901. — Influence de la température sur la perméabilité du protoplasme vivant pour l'eau et les substances dissoutes. *Bull. Acad. roy. Belg.* (*Cl. d. Sci.*), p. 173, mars 1901.

1889, 1. — M. Verworn, Die polare Erregung der Protisten durch den galvanischen Strom. *Pflüger's Archiv.*, Bd XLV et XLVI.

1889, 2. — *Psycho-physiologische Protistenstudien.* Jena, 1889.

1896. — Die polare Erregung der lebendigen Substanz. IV. Mitth. *Pflüger's Archiv.* Bd. LXV.

1900. — *Physiologie générale.* Trad. franç., Paris, 1900.

1878 et 1884. — H. Vöchting, *Ueber Organbildung im Pflanzenreich.* I. Th., Bonn, 1878; II. Th., Bonn, 1884.

1882. — *Bewegungen der Blüthen und Früchte.* Bonn, 1882.

1892. — *Ueber Transplantation am Pflanzenkörper.* Tübingen, 1892.

1900. — A. D. Waller, Four observations concerning the electrical effects of Light upon Green Leaves. *Proc. Physiolog. Soc.* June, 30, 1900.

1895. — H. J. Webber, Studies on the Dissemination and Leaf Reflexion of Yucca aloifolia and other species. *Sixth ann. Rep. of the Missouri Botan. Garden*, p. 91.

1868. — J. Wiesner, Beobachtungen über den Einfluss der Erdschwere auf Grössen und Formverhältnisse der Blätter. *Sitzb. d. math.-naturw. Cl. d. Akad. d. Wiss. in Wien*, Bd LVIII, Abth. I, S. 369.

1878 et 1880. — Die heliotropischen Erscheinungen im Pflanzenreiche I. Th. *Denkschr. d. k. Akad. d. Wiss z. Wien.* Bd XXXIX ; Th. *Ibid.*

1889. — *Biologie der Pflanzen.* Wien, 1889.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE SEPTEMBRE 1901 N° 9

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES MORPHOLOGIQUES ET EXPÉRIMENTALES SUR LE TRYPANOSOME DES RATS (Tr. Lewisi Kent.)

PAR MM. A. LAVERAN ET F. MESNIL

En novembre 1843, Gruby a décrit un Protozoaire parasite du sang de la grenouille, auquel il a donné le nom de *Trypanosoma*, en raison de ses mouvements en tarière (τρύπανον tarière, σῶμα corps); ce parasite avait été vu déjà par Gluge (1842) et Mayer (juillet 1843); Valentin avait observé (1841) un hématozoaire analogue chez la truite (*Salmo fario*[1]).

Depuis lors des Trypanosomes ont été signalés chez un grand nombre d'animaux appartenant à l'embranchement des Vertébrés, et il a été démontré que plusieurs épizooties graves atteignant les animaux domestiques avaient pour agents pathogènes des Trypanosomes : Surra de l'Inde, Nagana ou maladie de la mouche tsétsé qui produit de si grands ravages dans certaines régions de l'Afrique, maladie du coït ou Dourine, commune notamment en Algérie.

La connaissance des Trypanosomes ayant acquis en pathologie vétérinaire une grande importance, il nous a semblé utile de reprendre l'étude de ces parasites.

***

Des parasites qui paraissent bien devoir être rapportés aux Trypanosomes ont été signalés en 1845 par Gros, dans le sang

1. G. VALENTIN, *Müllers Archiv*, p. 435. — G. GLUGE, *même Rec.*, 1842, p. 148. — GRUBY, Acad. des Sc., 1843, *Comptes Rendus*, XVII, p. 1134.

d'un mulot[1], et en 1850 par Chaussat, dans le sang de *Mus rattus*, à Aubusson[2]. Lewis a décrit, en 1878, le Trypanosome des rats qu'il avait trouvé, au Bengale, dans le sang de *Mus decumanus* et de *Mus rufescens*[3].

Tr. Lewisi est de tous les Trypanosomes celui qui se prête le mieux à une étude prolongée et à l'expérimentation. Il est facile de se procurer des rats d'égout infectés naturellement, facile de conserver le parasite, de l'inoculer à des rats blancs et de suivre son évolution. Il était donc indiqué de commencer par ce parasite notre étude des Trypanosomes; nous avions d'ailleurs de bons guides.

Crookshank a donné du Trypanosome des rats une description plus complète que celle de Lewis; il a bien vu la membrane ondulante et le flagelle[4].

Danilewsky[5] et Chalachnikow[6] ont étudié avec soin ce parasite. Nous aurons souvent l'occasion de citer dans ce travail les excellents mémoires de L. Rabinowitsch et W. Kempner[7] et de Wasielewski et G. Senn[8] sur le Trypanosome des rats.

Plusieurs observateurs et Lewis lui-même[9] ont admis que le Trypanosome des rats était identique au Trypanosome découvert par Evans, aux Indes, dans le sang des animaux atteints de Surra; il est démontré aujourd'hui que ces parasites appartiennent à deux espèces bien distinctes au point de vue morphologique, comme au point de vue de l'action pathogène. Le Trypanosome du Nagana est probablement le même que celui du Surra, enfin le Trypanosome de la Dourine appartient à une espèce distincte; nous n'avons donc pas à citer ici les travaux qui concernent spécialement l'étude de ces parasites.

Le Trypanosome découvert en 1881 par R. Koch et

1. Gros, *Bullet. Soc. Natural.*, Moscou, 1845.
2. Chaussat, Thèse, Paris, 1850, n° 192.
3. T. Lewis, *Annual Report of san. com. with Gov. of India*, 1878, Appendix 14 et *Quart. Journ micr. sc.*, 1879.
4. Crookshank, *Journ. of the R. microsc. Soc.*, nov. 1886, p. 913.
5. Danilewsky, *Arch. slaves de biologie*, 1886-1887, et *Rech. sur la parasitologie comparée du sang*. Kharkow, 1888-89.
6. Chalachnikow, *Rech. sur les parasites du sang chez les animaux à sang froid et à sang chaud*. Kharkow, 1888.
7. L. Rabinowitsch et W. Kempner, *Zeitschr. f. u. Hyg. Infectionskr.*, 1899, t. XXX, p. 251.
8. Wasielewski et G. Senn, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infectionskr.*, 1900, t. XXXIII, p. 444.
9. Lewis, *Quarter. Journal of microsc. Sci.*, 1884, t. XXIV, p. 357-369.

v. Wittich chez le hamster (*Cricetus Frumentarius*) paraît aussi appartenir à une espèce distincte de *Tr. Lewisi* [1].

Le Trypanosome des rats était rangé naguère dans le genre *Herpetomonas* Kent (1881) ; on supposait qu'il y avait des différences notables de structure entre ce parasite et les Trypanosomes des grenouilles et des poissons appartenant au genre *Trypanosoma* Gruby.

Il résulte des recherches comparatives que nous avons faites sur les Trypanosomes des rats et du Nagana d'une part, et sur le Trypanosome de la grenouille verte d'autre part, que ces parasites sont construits exactement sur le même type et que par suite il n'y a pas lieu de conserver le genre *Herpetomonas* [2].

I. — Fréquence de l'infection naturelle des rats d'égout. — Modes d'infection. — Les rats seuls peuvent être infectés par *Tr. Lewisi*.

Les rats d'égout sont souvent infectés de Trypanosomes ; la fréquence de ces parasites a été constatée sur un grand nombre de points du globe.

T. R. Lewis, à Calcutta, a constaté que *Mus decumanus* et *Mus rufescens* étaient infectés dans la proportion de 29 0/0. Vandyke Carter, à Bombay, a trouvé des Trypanosomes chez 12 0/0 des rats examinés [3].

Lingard, qui observait également aux Indes, indique une proportion de 30 0/0, qui se rapproche beaucoup de celle trouvée par Lewis [4].

Crookshank, à Londres, a vu des Trypanosomes chez 25 0/0 des rats examinés.

R. Koch, à Daressalam, sur 24 rats capturés dans différentes maisons, en a trouvé 10 qui étaient infectés [5].

Rabinowitsch et Kempner ont constaté qu'à Berlin les rats sauvages étaient infectés dans la proportion de 41,8 0/0. Il n'y avait pas de différence notable suivant les quartiers.

1. R. Koch, *Mittheil, aus dem Kais. Gesundheitsamte*, 1881, t. I, p. 8.
2. A. Laveran et F. Mesnil, *Société de biologie*, 22 juin 1901, et *Comptes rendus de l'Acad. des Sc.*, 15 juillet 1901.
3. Vandyke Carter, *Scientific Memoirs by med. officers of the Army of India*, 1887, t. IV, p. 50.
4. Lingard, *Report on Horse Surra*, Bombay, 1893-1895.
5. R. Koch, *Reiseberichte über Rinderpest*, etc..., Berlin, 1898, p. 70.

A Paris, l'infection chez les rats d'égout (*Mus decumanus*) ne paraît pas commune; sur 43 rats examinés par nous, 2 seulement ont été trouvés infectés. A Lille, d'après les renseignements qui nous ont été fournis par M. le docteur Calmette, l'infection des rats d'égout est commune.

L'infection naturelle par les Trypanosomes n'a jamais été observée jusqu'ici chez les rats blancs ou tachetés; sur 83 rats de cette espèce examinés par L. Rabinowitsch et W. Kempner, aucun n'a été trouvé infecté; nous avons examiné plusieurs centaines de rats blancs sans en trouver un seul qui fût infecté naturellement de Trypanosomes. Cette absence d'infections naturelles par les Trypanosomes chez les rats blancs ou tachetés, qui sont cependant très sensibles à l'infection artificielle, rend ces animaux précieux pour l'étude de *Tr. Lewisi*.

Il est facile, comme l'a montré R. Koch, d'inoculer le Trypanosome du rat gris aux rats de même espèce ou bien aux rats blancs [1]. Le procédé le plus sûr consiste à inoculer le sang contenant les Trypanosomes dans le péritoine des rats que l'on veut infecter; nos observations confirment absolument sur ce point, celles de Rabinowitsch et Kempner. Nous n'avons jamais vu se produire d'accidents chez les animaux ainsi inoculés, lorsque le sang ne provenait pas d'animaux ayant des infections secondaires.

Les inoculations sous-cutanées réussissent également, mais l'apparition des Trypanosomes dans le sang est un peu moins rapide qu'après l'inoculation intra-péritonéale.

Tr. Lewisi ne se développe que chez les rats. Koch, Rabinowitsch et Kempner ont essayé sans succès d'inoculer le parasite à différents animaux : souris grises ou blanches, cobaye, lapin, chien, chèvre, cheval [2]. Le hamster lui-même, qui cependant est souvent infecté par des Trypanosomes très voisins de *Tr. Lewisi*, s'est montré réfractaire.

Lorsqu'on inocule du sang de rats infectés à d'autres animaux, on peut trouver, pendant 24 ou 48 heures, quelques Trypanosomes dans le sang des animaux inoculés, mais les Trypanosomes ne se multiplient pas et ne tardent pas à disparaître.

1. R. Koch, *Reiseberichte*, *loc. cit.*

2. Lingard dit avoir réussi à infecter différents animaux avec le Trypanosome des rats, mais Lingard, qui observait aux Indes, a confondu ce Trypanosome avec celui du Surra.

Après avoir injecté du sang riche en Trypanosomes (*Tr. Lewisi*), dans le péritoine de souris blanches, nous avons vu que les Trypanosomes se retrouvaient dans le péritoine et dans le sang après 24 heures; au bout de 48 heures ils avaient toujours disparu.

Le cobaye est, en dehors des rats, le seul animal chez lequel nous avons observé un commencencement d'infection par *Tr. Lewisi*. Lorsqu'on injecte dans le péritoine d'un cobaye, et surtout d'un jeune cobaye, du sang riche en Trypanosomes, on constate, au bout de 24 ou de 48 heures, des formes de multiplication très nombreuses dans le péritoine; les Trypanosomes se montrent en plus ou moins grand nombre dans le sang, mais bientôt ils disparaissent du sang, comme de l'exsudat péritonéal. Nous reviendrons plus loin sur les formes d'involution de *Tr. Lewisi* chez le cobaye.

L'infection naturelle chez les rats gris vivant à l'état sauvage paraît se faire par les puces et peut-être par les poux qui, après avoir sucé le sang des animaux infectés, vont piquer des animaux sains.

En écrasant des poux capturés sur des rats infectés, nous avons trouvé dans leur estomac, au milieu de sang hémolysé, des Trypanosomes: Rabinowitsch et Kempner n'ont pas réussi à voir des Trypanosomes en examinant des puces capturées sur des rats infectés, mais, en écrasant dans de l'eau physiologique quelques-uns de ces insectes, et en inoculant dans le péritoine de rats neufs cette dilution, ils ont produit des infections 5 fois sur 9. Ils ont fait en outre les expériences suivantes :

Un rat blanc infecté est mis avec des rats blancs non infectés; au bout de 11 à 15 jours on constate l'apparition de Trypanosomes dans le sang des rats neufs.

Des puces capturées sur des rats infectés sont portées sur de rats sains; chez un de ces rats, on voit apparaître au bout de quelques jours des Trypanosomes dans le sang.

Ces expériences paraissent démontrer que les puces jouent dans la transmission de *Tr. Lewisi* un rôle analogue à celui de la mouche tsétsé dans la transmission du Nagana.

Les essais d'infection par la voie stomacale ont toujours donné des résultats négatifs[1].

1. Les rats peuvent s'infecter en mangeant des aliments souillés avec le sang

Les parasites ne semblent pas pouvoir traverser le placenta. Lorsque des femelles pleines sont infectées, on ne trouve pas de Trypanosomes dans le sang des fœtus. Chaussat avait déjà signalé ce fait.

II. — Technique pour l'étude morphologique de *Tr. Lewisi*. — Observation a l'état frais. — Action de la température. — Longue conservation a la glacière. — Procédés de coloration.

L'observation des Trypanosomes dans le sang frais est facile; on coupe l'extrémité de la queue d'un rat infecté, on recueille une goutte de sang sur une lame porte-objet et on recouvre avec une lamelle; le sang doit être étalé en couche mince; il importe, en effet, que les Trypanosomes ne soient pas dissimulés, sur tous les points de la préparation, au milieu des hématies. Les mouvements que les Trypanosomes impriment aux hématies permettent de reconnaître l'existence des parasites à un faible grossissement, ce qui facilite leur recherche quand ils sont en petit nombre dans le sang.

Dans les cas où l'on veut faire des observations prolongées, il faut employer les préparations en goutte pendante qui sont très utiles notamment pour l'étude du phénomène de l'agglutination. Le sang est mélangé à de l'eau physiologique ordinaire, puis défibriné à de l'eau physiologique citratée de manière à empêcher la coagulation, ou encore à du sérum de rat normal ou d'autres animaux. Lorsque nous avions besoin d'une certaine quantité de sang ou de sérum, les rats étaient saignés à la carotide, ce qui est facile, au moins chez les gros rats.

La durée de conservation des Trypanosomes dans les préparations en goutte pendante ou dans le sang conservé dans des tubes stérilisés est assez variable.

Danilewsky a observé des Trypanosomes vivants dans du sang de rat recueilli depuis 8 à 9 jours dans une pipette et conservé à la température du laboratoire. Les jeunes Trypanosomes peuvent résister, dit-il, un peu plus longtemps, soit 10 à 12 jours [1].

à Trypanosomes ou en dévorant d'autres rats infectés, mais à condition que le museau soit écorché. Rogers a fait, à ce sujet, des expériences très probantes avec le Trypanosome du Surra (*Proceed. of the R. Soc.*, 4 mai 1901).

1. *Op. cit.*, p. 74.

Il résulte de nos observations que la température exerce une grande influence sur la durée de conservation de *Tr. Lewisi*.

Pendant l'été, les Trypanosomes conservés dans le laboratoire ne survivent guère au delà de 4 jours; en hiver, nous avons conservé du sang à Trypanosomes (mélangé à du sérum de rat, de poule ou de pigeon) en goutte pendante dans le laboratoire pendant 18 jours : au bout de ce temps, le sang était profondément altéré, mais on distinguait encore quelques Trypanosomes mobiles.

A la température de la glacière (5 à 7° C. au-dessus de 0) la durée de conservation de *Tr. Lewisi* augmente beaucoup[1]. Nous avons trouvé des Trypanosomes mobiles dans du sang débriné, mélangé d'eau physiologique, conservé à la glacière depuis 30, 36, 44, 47, 49, 50, 51 et 52 jours.

Au sortir de la glacière, les mouvements des Trypanosomes sont ralentis, ils s'accélèrent à mesure que le sang se réchauffe.

L'observation suivante montre bien l'influence de la température sur la durée de la conservation de *Tr. Lewisi*.

Un rat blanc fortement infecté de Trypanosomes est saigné le 2 août 1900. Le sang, recueilli avec pureté dans la carotide, est mélangé d'eau physiologique à parties égales et défibriné. Un échantillon du sang est mis à la glacière le 2 août, un autre échantillon identique au premier est conservé à la température du laboratoire.

A. — *Sang conservé à la température du laboratoire* (15 à 20 degrés).

5 août. — Les Trypanosomes libres ou agglomérés ont des mouvements ralentis.

8 août. — On ne voit plus aucun Trypanosome mobile.

B. — *Sang mis a la glacière.*

5 août. — Les Trypanosomes isolés ou agglomérés en rosaces (voir ch. IV) sont animés de mouvements très vifs.

8 août. — Trypanosomes nombreux, très mobiles, formant souvent de grandes agglomérations.

15-24 août. — Trypanosomes isolés ou agglomérés, moins nombreux que lors de l'examen fait le 8 août; les mouvements sont ralentis.

18 septembre. — On trouve encore des Trypanosomes mobiles.

22 septembre. — On ne voit plus de Trypanosomes mobiles.

Dans ce cas, les Trypanosomes n'ont donc vécu que quatre à cinq jours dans le sang conservé au laboratoire, tandis que dans le sang mis à la glacière ils vivaient encore au bout d'un mois et demi.

Des échantillons de sang à Trypanosomes conservés à la

1. Laveran et Mesnil, *Soc. de biologie*, 6 octobre 1900.

glacière depuis 44, 47, 51 et 52 jours se sont montrés encore virulents, il y a eu seulement un retard dans l'apparition des Trypanosomes dans le sang des rats inoculés.

La durée de conservation est beaucoup diminuée si le sang n'a pas été recueilli avec pureté, et si des bactéries s'y développent en grand nombre.

Les Trypanosomes supportent assez bien une température de 41°; à 50° les mouvements se ralentissent rapidement et, au bout de 5 minutes, on ne voit plus aucun Trypanosome mobile.

On ne voit jamais apparaître des formes de multiplication dans le sang conservé soit en goutte pendante à la température du laboratoire, soit dans des tubes à la glacière. Comme les Trypanosomes s'agglomèrent sur certains points, on peut avoir parfois l'illusion d'une multiplication des parasites.

Pour observer les formes de multiplication, il faut examiner le sang d'un rat inoculé depuis 4 à 8 jours : au delà de ce laps de temps on ne trouve plus dans le sang que des Trypanosomes arrivés à leur développement complet ; c'est ainsi que chez les rats d'égout infectés naturellement et, en général, depuis assez longtemps, on chercherait en vain des formes de multiplication. En examinant l'exsudat péritonéal d'un rat inoculé dans le péritoine depuis 24 à 48 heures, on peut voir aussi des formes de multiplication en grand nombre.

Pour étudier la structure des Trypanosomes, il est indispensable d'avoir des préparations colorées et colorées d'après une méthode particulière. La méthode suivante[1] est celle qui nous a donné les meilleurs résultats.

Le sang est étalé en couche mince sur une lame porte-objet, séché rapidement, et fixé dans l'alcool absolu (10 à 15 minutes).

Les solutions qui suivent doivent être préparées à l'avance.

1° Bleu de méthylène à l'oxyde d'argent ou *bleu Borrel*. Dans une fiole de 150 c. c. environ, on met quelques cristaux d'azotate d'argent et 50 à 60 c. c. d'eau distillée; quand les cristaux sont dissous, on remplit la fiole avec une solution de soude et on agite; il se forme un précipité noir d'oxyde d'argent qui est lavé à plusieurs reprises à l'eau distillée, de manière à enlever l'azotate de soude et l'excès de soude. On verse alors sur l'oxyde d'argent une solution aqueuse saturée de bleu de mé-

1. Laveran, *Soc. de biologie*, 9 juin 1900.

thylène préparée avec du bleu de méthylène médicinal de Höchst; on laisse en contact pendant 15 jours en agitant à plusieurs reprises; 2° solution aqueuse d'éosine à 1 0/00 (éosine soluble dans l'eau de Höchst); 3° solution de tannin à 5 0/0.

On prépare, *au moment de s'en servir*, le mélange colorant d'après la formule suivante :

Solution d'éosine à 1 0/00.....	4 centimètres cubes.
Eau distillée.....	6 —
Bleu Borrel.....	1 centimètre cube.

La lame porte-objet sur laquelle le sang a été étalé et fixé est plongée dans le mélange colorant qui a été versé dans une boîte de Pétri, par exemple, et on l'y laisse de 20 à 30 minutes.

Au sortir du bain la préparation est lavée à grande eau, puis traitée par la solution de tannin (10 à 15 minutes), on lave de nouveau à grande eau, puis à l'eau distillée et on sèche.

Lorsqu'il s'est formé un précipité qui gêne pour l'examen on lave à l'essence de girofle, puis au xylol, et on passe un linge fin trempé dans le xylol à la surface de la préparation.

Les préparations se conservent mieux à sec que dans le baume et surtout que dans l'huile de cèdre où elles se décolorent rapidement.

Lorsque la coloration est bien réussie, le protoplasme des Trypanosomes se colore en bleu clair, les noyaux se colorent en violet ainsi que les centrosomes et les flagelles, dans leur partie libre aussi bien que dans la partie qui borde la membrane ondulante; la membrane ondulante reste incolore ou prend une teinte bleuâtre très pâle. Les hématies sont colorées en rose, les noyaux des leucocytes en violet foncé.

Wasielewski et Senn ont obtenu de bons résultats en se servant de la méthode de Romanowsky modifiée par Nocht. La méthode de coloration indiquée plus haut nous paraît être d'un emploi plus facile et plus sûr que la méthode de Romanowsky primitive ou modifiée.

Lorsqu'on veut colorer rapidement une préparation contenant des Trypanosomes ou bien lorsqu'on n'a pas à sa disposition les colorants nécessaires pour appliquer la méthode que nous préconisons, on peut colorer avec la solution alcoolique

de fuchsine ou bien avec une solution de phénate de thionine. Le noyau, le centrosome et le flagelle se colorent plus fortement que le protoplasme, et l'on obtient ainsi des préparations qui suffisent, dans la pratique, quand il s'agit seulement de reconnaître l'existence des Trypanosomes et leur abondance.

Par le procédé de Heidenhain, le noyau, le centrosome et le flagelle se colorent plus fortement que le protoplasme, mais sont naturellement beaucoup moins apparents que lorsqu'ils prennent une teinte bien différente de celle du protoplasme, comme dans notre procédé et dans celui de Romanowsky.

III. — Morphologie. — Structure de *Tr. Lewisi*. — Modes de multiplication. — Formes d'involution. — Différences morphologiques avec quelques trypanosomes voisins.

Nous examinerons : 1° le parasite arrivé à son développement complet ; 2° les formes de multiplication.

1° *Forme adulte de Tr. Lewisi.* Dans le sang frais, *Tr. Lewisi* se présente sous l'aspect d'un vermicule très mobile qui est garni, d'un côté, d'une membrane ondulante ; les extrémités sont effilées et l'une d'elles se termine en flagelle.

Le parasite est toujours libre dans le plasma, à aucune période de son évolution il n'est endoglobulaire ; il se meut avec une grande vivacité au milieu des hématies auxquelles il imprime des mouvements très variés, sans les altérer d'ailleurs.

Les mouvements s'exécutent au moyen de la membrane ondulante et du flagelle ; de plus, le corps s'infléchit dans tous les sens tout en conservant sa forme. Lorsque les mouvements sont ralentis (ce qui arrive dans les préparations faites depuis quelque temps), on voit bien les ondulations en forme de vague de la membrane ondulante, ondulations qui se font tantôt dans un sens et tantôt dans l'autre.

Le Trypanosome se meut en général le flagelle en avant ; on doit donc considérer l'extrémité portant le flagelle comme l'extrémité antérieure : c'est d'ailleurs la règle chez les Flagellés.

On distingue dans le protoplasme qui constitue le corps des Trypanosomes de fines granulations et souvent, vers la partie postérieure, une granulation assez réfringente qui correspond à ce que nous décrirons plus loin comme le centrosome.

Le noyau n'est pas apparent.

Tr. Lewisi mesure, flagelle compris, 24 à 25 μ de long sur 1 1/2 μ de large environ.

Après coloration par le procédé indiqué plus haut, la structure de *Tr. Lewisi* apparaît très nettement. (Fig. 1 et Pl. XI. fig. 1.) Dans le protoplasme coloré en bleu clair, on distingue le noyau (*n*) coloré en violet; un amas beaucoup plus petit de chromatine (*c*) situé vers l'extrémité postérieure se colore plus fortement; enfin, le long du bord libre de la membrane ondulante (*m*), un filament également coloré en violet se continue d'un côté avec le flagelle (*f*), tandis qu'à l'autre extrémité il aboutit au corpuscule indiqué dans la figure par la lettre *c*. La membrane ondulante, si l'on en excepte son bord épaissi, en continuité avec le flagelle, est incolore.

Le protoplasme contient souvent de fines granulations.

Le noyau situé d'ordinaire plus près de l'extrémité antérieure que de la postérieure a une forme allongée; à l'intérieur, des granulations se colorent plus fortement que la masse chromatique principale.

Le corpuscule (*c*) placé à la base du flagelle a été considéré par Rabinowitsch et Kempner, qui l'ont découvert, comme un nucléole, par Plimmer et Bradford[1] comme un micronucleus, par Wasielewski et Senn, qui ont vu ses rapports avec le flagelle, comme un épaississement du périplaste assimilable à un blépharoplaste. A plusieurs reprises, nous avons discuté la nature de ce corpuscule et cherché à démontrer qu'il s'agissait d'un centrosome[2]. Nous ne reproduirons pas ici tous les arguments que nous avons fait valoir en faveur de cette opinion; nous rappellerons seulement que les corpuscules en question ont la plus grande ressemblance avec les centrosomes des Spermatozoïdes et avec ceux des Noctiluques. Dans les Trypanosomes, les noyaux se divisent par amitose; on ne peut donc pas saisir sur le fait le rôle centrosomique des corpuscules dont nous parlons. Il n'en est pas de même pour les Noctiluques; les divisions nucléaires préparatoires du bourgeonnement de ces Protozoaires sont du type mitosique, et l'existence de sphères attractives aux pôles des fuseaux de division a été démontrée.

1. Plimmer et Bradford, *Centralbl. f. Bakter.*, I. Abtheil, XXVI, 1899.
2. Laveran et Mesnil, *Soc. de Biologie*, 17 novembre 1900 et 29 mars 1901.

Or, quand les divisions nucléaires sont finies et que les petits bourgeons se différencient, Ishikawa[1] a vu le flagelle de la jeune Noctiluque se développer à partir de la sphère attractive et probablement à ses dépens, et ce flagelle reste en rapport avec le corpuscule centrosomique.

Le centrosome qui se colore fortement se trouve en général au centre d'un espace clair; le flagelle s'arrête d'ordinaire ou paraît s'arrêter au bord de cet espace vacuolaire. Il n'est pas douteux d'ailleurs qu'il y ait continuité entre le flagelle et le corpuscule centrosomique. Quand des Trypanosomes se détruisent, dans du sang qui a été conservé quelque temps, avant d'être desséché, on trouve parfois sur les préparations colorées des Trypanosomes en mauvais état, réduits au flagelle et au centrosome représentant pour ainsi dire le squelette du parasite (fig. 16) et, dans ces conditions, on constate nettement la continuité du flagelle avec le centrosome.

2° *Formes de multiplication.* Les auteurs ne sont pas d'accord sur la manière dont *Tr. Lewisi* se multiplie.

D'après Danilewsky il faudrait distinguer : 1° la division longitudinale qui se fait tandis que le Trypanosome est en mouvement : 2° la multiplication par segmentation ; dans ce dernier mode de division, le flagelle et la membrane ondulante disparaîtraient, le parasite prendrait une forme sphérique, et le noyau, en se divisant à plusieurs reprises, donnerait naissance à un nombre variable de jeunes éléments.

L. Rabinowitsch et Kempner admettent : 1° une division longitudinale ; 2° une division transversale ; 3° la segmentation ; la membrane ondulante et le flagelle disparaîtraient complètement dans ce dernier cas.

D'après Wasielewski et Senn, tout le processus de division des Trypanosomes se réduit à une division longitudinale, comme chez les autres Flagellés, avec cette exception que chez le Trypanosome en voie de division, la cellule mère est toujours reconnaissable à ses dimensions qui dépassent celles de la cellule ou des cellules filles. La cellule mère et les cellules filles peuvent rester adhérentes pendant quelque temps de manière à constituer des espèces de rosaces. Wasielewski et Senn font des réserves au sujet de la segmentation primitive multiple, ils

1. Ishikawa, *Journ. Coll. Sciences*, Tokyo, 1894 et 1899.

donnent cependant une figure de division dans laquelle on cherche en vain la cellule mère.

Les formes que revêt *Tr. Lewisi* au moment de sa multiplication sont très variées et, au premier abord, lorsqu'on examine une préparation dans laquelle ces formes de multiplication sont nombreuses, on a quelque peine à s'y reconnaître; on distingue de très gros Trypanosomes à côté de Trypanosomes très petits, certains Trypanosomes en voie de division ont conservé une forme à peu près normale, d'autres ont des formes singulières et des plus variées.

Dans le sang frais il est facile de constater, en raison de cette variété des formes, si les Trypanosomes sont ou non en voie de multiplication : mais c'est seulement sur des préparations bien colorées, par la méthode indiquée plus haut, que l'on peut étudier convenablement l'évolution de ces hématozoaires. L'examen du sang frais contenant des Trypanosomes en voie de multiplication révèle cependant un fait intéressant, c'est que les parasites, tandis qu'ils se divisent, continuent à se mouvoir, les mouvements sont seulement ralentis.

Soit une préparation de sang de rat bien colorée et riche en formes de multiplication de Trypanosomes. Si nous passons en revue un grand nombre de ces formes, il nous sera possible de les classer en deux groupes : groupe *a* représenté par les figures 2 à 5, groupe *b* représenté par les figures 6 à 9.

Groupe a. Le Trypanosome qui va se diviser augmente de volume, sa longueur atteint parfois 35 μ, sa largeur est triplée ou quadruplée (fig. 2 et Pl. XI, fig. 2). En même temps le noyau et le centrosome augmentent de volume, ce dernier prenant une forme allongée; la base du flagelle s'épaissit. Enfin le noyau se rapproche du centrosome.

A une phase plus avancée le noyau et le centrosome se divisent. Comme Rabinowitsch et Kempner, Wasielewski et Senn le font remarquer, il n'y a pas de règle absolue pour l'ordre dans lequel se fait cette division; tantôt c'est le centrosome qui se divise le premier et tantôt c'est le noyau.

En même temps que le centrosome, la base épaissie du flagelle se divise (fig. 3).

Le flagelle de nouvelle formation se sépare de l'ancien flagelle (Pl. XI, fig. 3) sans qu'il y ait dédoublement de ce dernier dans

toute sa longueur, et l'on a alors un gros Trypanosome avec deux noyaux, deux centrosomes et deux flagelles, l'un de ces flagelles étant beaucoup plus court que l'autre. Le flagelle de nouvelle formation s'allonge rapidement (fig. 4). Le protoplasme se divise à son tour; on voit alors un petit Trypanosome à court

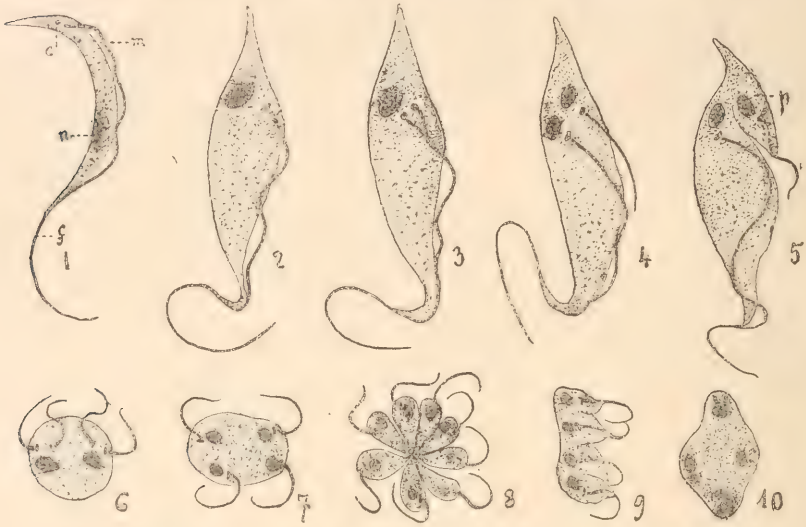


Fig. 1. Trypanosome arrivé à son développement complet, *n* noyau, *c* centrosome, *m* membrane ondulante, *f* flagelle. — Fig 2 à 5. Trypanosomes en voie de multiplication; la figure 5 montre un petit Trypanosome *p* sur le point de se séparer du Trypanosome mère. — Fig. 6 à 9. Autres aspects des formes de multiplication. — Fig. 10. Forme de multiplication insuffisamment colorée, les flagelles sont invisibles. (Gr. 2000 D environ).

flagelle qui adhère encore plus ou moins au Trypanosome mère (fig. 5 et Pl. XI, fig. 4). Avant que ce Trypanosome de nouvelle formation devienne libre, il peut se diviser et le Trypanosome mère peut donner naissance à d'autres parasites; ainsi s'expliquent les groupements qui se composent d'un grand Trypanosome et de plusieurs petits Trypanosomes. (Pl. XI, fig. 5) formant parfois des espèces de rosaces.

Groupe b. Les formes de multiplication de ce groupe diffèrent de celles du précédent par ce fait qu'on ne distingue plus de Trypanosome mère. Les éléments parasitaires, de dimensions variées, ont une forme sphérique, ovoïde ou irrégulière. Dans le protoplasme, on distingue des noyaux en nombre variable,

des centrosomes voisins des noyaux et, partant de ces centrosomes, des petits flagelles de même longueur.

Le nombre des noyaux est souvent de 2, 4, 8 ou 16. Le nombre des centrosomes peut être double de celui des noyaux parce que la division des centrosomes a précédé celle des noyaux (fig. 6).

Les noyaux, les centrosomes et les flagelles se divisent d'abord sans qu'il y ait trace de division du protoplasme (fig. 7); à un moment donné le protoplasme se dentelle à la périphérie (fig. 9) et se divise en fin de compte en autant d'éléments qu'il y a de noyaux et de centrosomes (fig. 8 et pl. XI, fig. 7). La multiplication des noyaux se fait toujours par division directe.

Dans les formes en voie de multiplication, on voit toujours les flagelles quand la coloration est suffisante. Au début de nos recherches sur *Tr. Lewisi*, nous obtenions souvent des figures analogues à certaines figures de Rabinowitsch et Kempner dans lesquelles les flagelles semblent avoir disparu; la figure 10 représente un de ces éléments, on distingue 4 noyaux et 8 centrosomes sans flagelles. Depuis que nous avons appris à mieux colorer les Trypanosomes, nous n'obtenons plus jamais de semblables figures, les flagelles sont toujours visibles, ce qui est en rapport avec ce que nous avons dit plus haut sur la mobilité des Trypanosomes en voie de division.

Les formes de multiplication du groupe *b* dérivent évidemment de celles du groupe *a*. Lorsque le petit Trypanosome *p* (fig. 5) s'est séparé du Trypanosome mère, son noyau, son centrosome et son flagelle continuant à se diviser, sans division concomitante du protoplasme, on comprend facilement l'apparition d'éléments analogues à ceux que représentent les figures 6, 7 et 9. Les petits éléments provenant de la dislocation des rosaces peuvent encore se diviser en deux (Pl. XI, fig. 8 et 9), ce qui explique l'existence de formes très petites.

En somme, le mode de multiplication du Trypanosome des rats est toujours le même; il y a toujours division du noyau, du centrosome et de la base du flagelle, mais les variétés d'aspects qui résultent de la division simple ou répétée de ces éléments et de la division précoce ou tardive du protoplasme sont nombreuses.

Tr. Lewisi présente dans l'organisme du cobaye certaines

modifications qu'il faut attribuer vraisemblablement à un processus d'involution. La culture qui se produit dans le péritoine à la suite de l'inoculation du sang contenant des Trypanosomes a un aspect anormal; les formes de multiplication sont encore plus variées que chez le rat, les très petites formes dominent. Au bout de 24 à 48 heures, les Trypanosomes de l'exsudat péritonéal et du sang présentent un point très réfringent qui, au premier aspect, pourrait être confondu avec le centrosome en

Fig. 11. Trypanosome dans le sang frais du cobaye, *v*. corpuscule réfringent. — 12. Trypanosome dans une préparation colorée du sang de cobaye, *c*, centrosome, *v*, vacuole. — 13 et 14. Trypanosomes colorés après un séjour de 20 jours à la glacière. — 15. Trypanosome déformé après être resté 9 jours en goutte suspendue (sang et sérum de poule). — 16. Centrosome et flagelle, reliquat d'un Trypanosome dans une préparation colorée.

raison de son siège constant non loin de l'extrémité postérieure; sur les préparations colorées il est facile de s'assurer que le centrosome a son aspect normal et que, à côté, il existe une vacuole arrondie, incolore, qui correspond évidemment au point réfringent observé chez le Trypanosome vivant.

La figure 11 représente un Trypanosome vu dans le sang frais du cobaye; la figure 12, un Trypanosome dans une préparation colorée de sang de cobaye.

Les Trypanosomes, conservés quelque temps en goutte suspendue, deviennent granuleux en même temps que leurs mouvements se ralentissent. De grosses granulations se forment chez les Trypanosomes qui sont à la glacière depuis quinze jours ou plus; ces granulations se colorent comme le centrosome et atteignent souvent le volume de ce dernier; leur nombre et

leur disposition sont variables. Les fig. 13 et 14 représentent deux Trypanosomes colorés après un séjour de 20 jours à la glacière.

La figure 15 représente un Trypanosome dans une préparation colorée faite avec du sang mélangé à du sérum de poule, et conservé en goutte suspendue pendant 9 jours; il s'est produit une déformation qui existait chez la plupart des Trypanosomes de cet échantillon de sang.

Lorsque les Trypanosomes sont morts, ils se déforment rapidement et deviennent méconnaissables.

Il n'est pas possible de donner ici les caractères différentiels de *Tr. Lewisi* et de tous les autres Trypanosomes : beaucoup de ces Trypanosomes (ceux du hamster, du cobaye, du lapin notamment) sont incomplètement connus.

Nous avons vu que quelques observateurs avaient admis l'identité de *Tr. Lewisi* et du Trypanosome du Surra qui est probablement le même que celui du Nagana (*Tr. Brucei*).

En dehors de l'action pathogène, si différente pour les deux espèces de parasites, on peut différencier *Tr. Lewisi* de *Tr. Brucei* en s'en tenant aux caractères morphologiques.

Les dimensions sont à peu près les mêmes, mais l'aspect général diffère : *Tr. Lewisi* est plus mince, plus effilé que *Tr. Brucei*, sa membrane ondulante est moins plissée que celle de ce dernier; après coloration, on voit chez *Tr. Brucei* des granulations chromatiques plus grosses et plus nombreuses que chez *Tr. Lewisi*. L'extrémité postérieure de *Tr. Lewisi* est souvent plus effilée que celle de *Tr. Brucei*, mais il ne faut pas attribuer trop d'importance à ce caractère; on trouve dans les deux espèces des individus qui diffèrent très peu à cet égard; les formes de multiplication sont très différentes [1].

Koch rapporte que chez des rats infectés de *Tr. Lewisi* auxquels il avait inoculé *Tr. Brucei*, il a réussi à distinguer, dans les préparations histologiques du sang, les deux espèces de parasites [2]. L. Rogers a fait des observations semblables aux Indes avec le Trypanosome du Surra [3].

1. Laveran et Mesnil, *Soc. de biologie*, 29 mars 1901.
2. R. Koch, *Reiseberichte über Rinderpest, etc.*, Berlin, 1898, p. 70.
3. L. Rogers, *Proc. of the R. Soc.*, 4 mai 1901.

Lorsqu'on examine le sang frais des rats infectés simultanément avec *Tr. Lewisi* et *Tr. Brucei*, il est très difficile de distinguer les deux espèces de parasites; mais, sur des préparations colorées, le diagnostic ne présente plus de difficultés.

IV. — Phénomènes d'agglomération des trypanosomes[1]

Dans un certain nombre de conditions, les Trypanosomes se réunissent en amas très réguliers, qu'il est facile de caractériser. Les circonstances qui provoquent la formation de ces amas peuvent être groupées en deux catégories distinctes :

1° L'agglomération se produit dans du sang défibriné conservé depuis un temps plus ou moins long à la glacière; le phénomène est toujours partiel. Il persiste jusqu'à la mort et la dégénérescence des flagellés (voir Ch. II);

2° Quand on fait agir sur du sang défibriné à Trypanosomes, le sérum d'un certain nombre d'animaux, et en particulier celui de rats ayant reçu une ou plusieurs injections de sang à Trypanosomes, on constate une mise en amas *rapide* (quelques minutes) et souvent *totale* des Trypanosomes. Tantôt, les agglomérations persistent jusqu'à la mort des parasites; tantôt le phénomène est suivi d'une « désagglomération ». — Tous les phénomènes de cette seconde catégorie ont encore ceci de commun qu'ils sont produits par des substances que, par analogie avec ce que l'on sait des agglutinations bactériennes ou hématiques, on a le droit d'appeler des *agglutinines*, étant donnée leur façon de se comporter vis-à-vis de la chaleur.

Formation et morphologie des agglutinats. — Pour bien étudier la façon dont se forment les amas de Trypanosomes, il convient de s'adresser aux phénomènes de la première catégorie. Tout se passe avec une grande lenteur ; l'intensité du phénomène n'est jamais considérable.

Un premier fait à noter et certainement le plus important de tous, car il va donner la clef de toutes les particularités que nous relèverons, c'est que la mise en amas des Trypanosomes n'est pas précédée de leur immobilisation. *Les Trypanosomes qui s'agglomèrent sont aussi mobiles que ceux qui*, dans des préparations témoin ou dans la même préparation, *restent isolés.*

1. Note préliminaire *in Comptes rendus Soc. Biologie*, 17 novembre 1900.

Le début de l'agglomération est toujours le même : deux Trypanosomes s'accolent par leurs extrémités postérieures non flagellifères[1] (Pl. XII, fig. 1) ; la zone de contact est toujours très faible ; elle suffit pour maintenir l'union des deux individus qui forment une ligne droite et se meuvent sur place avec vivacité [2].

Généralement, les choses n'en restent pas là ; d'autres individus viennent se joindre aux deux premiers et il se constitue une *rosace* d'un nombre variable d'éléments, disposés tous avec les extrémités postérieures au centre de l'amas, les flagelles libres et bien mobiles à la périphérie (Pl. XII, fig. 2). On peut arriver à avoir ainsi des amas formés d'une centaine d'individus et rien n'est plus curieux que de les observer : chaque Trypanosome a conservé ses mouvements propres ; il paraît chercher à se dégager, à s'échapper des entraves qui le retiennent et nous verrons qu'en fait, dans certains cas, il peut y parvenir. — Non rarement, surtout quand il s'agit d'amas se constituant dans du sang conservé à la glacière, on trouve au centre un leucocyte ou un amas d'hématoblastes plus ou moins avariés.

Mais les agglomérats ne se constituent pas toujours aussi lentement. En particulier, dans le cas des véritables agglutinines, on voit d'emblée un nombre assez grand de Trypanosomes s'unir pour constituer un amas. Ces Trypanosomes se dirigent l'un vers l'autre, sans présenter d'abord la moindre orientation ; cette période dure peu et il est fréquent qu'on n'arrive pas à la saisir. Bientôt en effet les Trypanosomes s'orientent ; toutes les extrémités postérieures viennent s'affronter et l'on a la disposition en rosace que nous avons décrite.

Mais, quand on a affaire à des sérums très agglutinants et en particulier à des sérums spécifiques, les choses peuvent se compliquer. Un certain nombre de rosaces se groupent et arrivent à constituer des *amas secondaires* énormes (Pl. XII, fig. 3) qui, par suite des mouvements de tous leurs composants, écartent les hématies qui les entourent ; on arrive alors à avoir, en gouttes pendantes, un phénomène visible à l'œil nu ; sur le

1. On peut avoir quelque hésitation sur les extrémités accolées quand on observe à l'état frais ; on n'en a pas quand on examine des préparations colorées — Les figures de notre planche XII auxquelles nous renvoyons sont extraites de frottis colorés.

2. Quand nous étudierons le Trypanosome du Nagana, nous citerons des cas où l'agglutination se réduit à ces unions par deux.

fond rouge, apparaissent des taches claires à centre grisâtre.

Enfin, quand il y a persistance des agglutinats, on constate que les Trypanosomes du centre de ces amas secondaires finissent par s'immobiliser et entrer en dégénérescence; seuls, ceux de la périphérie conservent leur mobilité.

L'adhérence, dans tous ces cas, est souvent assez forte pour qu'on puisse étaler le sang en couche mince sans défaire les agglomérations. On peut alors obtenir de fort jolies préparations colorées; nous avons cherché, dans notre planche XII, à en donner une idée. Jamais nous n'avons observé la moindre altération morphologique des Trypanosomes qui viennent de s'agglomérer.

Agglomération de Trypanosomes morts ou paralysés... — Ordinairement, nous l'avons dit, les Trypanosomes agglutinés ont conservé leur mobilité. Que se passe-t-il quand on s'adresse à des Trypanosomes préalablement immobilisés? Nous avons pu résoudre cette question : 1° en tuant les flagellés par le chloroforme ou le formol; 2° en étudiant l'action de quelques-uns de nos sérums spécifiques qui se sont montrés, à fortes doses, paralysants pour les Trypanosomes.

Si l'on étale le sang à Trypanosomes en couche peu épaisse et qu'on le soumette aux vapeurs de chloroforme, tous les flagellés meurent entre 5 et 15 minutes et prennent un aspect granuleux; leurs contours deviennent peu nets et ils sont moins faciles à observer. Une trace de formol ajoutée au sang donne de meilleurs résultats; les Trypanosomes sont bien fixés et conservent toute leur réfringence.

Les sérums qui agglutinent les Trypanosomes vivants agglutinent également les Trypanosomes morts, et *vice versa*. Mais les agglomérations n'ont plus le caractère que nous avons décrit. *Les éléments y sont disposés tout à fait sans ordre.* Ainsi, avec les Trypanosomes tués au chloroforme, on a des amas où les microbes dessinent un réseau à mailles plus ou moins serrées. Avec les Trypanosomes fixés au formol, les amas sont assez compacts, mais les Trypanosomes y sont disposés pêle-mêle.

Nos sérums paralysants (à partir d'une certaine dose) ne supprimaient pas totalement la mobilité des Trypanosomes; mais ils la restreignaient considérablement. Dans ces conditions, les amas formés étaient comparables à ceux obtenus avec les

Trypanosomes tués au formol ; souvent ils avaient la forme de gerbes. — A doses faibles, ces sérums ne se montraient sensiblement plus paralysants ; mais ils étaient encore très agglutinants ; on avait alors des rosaces.

Tous ces faits ne comportent, croyons-nous, qu'une interprétation. La forme des agglomérats, dans les cas ordinaires, est en rapport avec la mobilité des Trypanosomes. Dans un amas qui tend à se former, chaque Trypanosome cherche à s'échapper, son flagelle en avant ; la figure d'équilibre qui est réalisée est donc celle d'une rosace dont tous les individus ont l'extrémité postérieure au centre, le flagelle à la périphérie.

« *Désagglomération.* » — Cette considération de la mobilité des Trypanosomes permet aussi de se rendre compte d'un phénomène curieux que l'on observe souvent avec les agglomérations de Trypanosomes, et qui n'a jusqu'ici, et pour cause, jamais été signalé avec les agglutinations bactériennes.

Il arrive que des Trypanosomes, agglomérés presque aussitôt après leur mise en contact d'un sérum, redeviennent libres et isolés dans les heures qui suivent : les amas secondaires se désagrègent ; les rosaces, ou se désagrègent complètement, ou perdent un grand nombre de leurs éléments[1]. C'est là un fait tout à fait déconcertant quand on aborde l'étude de ces phénomènes. Il ne se produit pas avec tous les sérums et il se produit d'autant mieux avec un sérum déterminé que la dose employée est plus faible. D'autre part, il ne se manifeste qu'autant que les Trypanosomes ont une certaine mobilité. Grâce à leurs efforts, les Trypanosomes qui ne sont pas retenus par une force trop grande, arrivent à se dégager. Mais on conçoit que, si la mobilité des Trypanosomes diminue, il peut y avoir de nouveau réagglutination : nous l'avons constaté quelquefois. On peut empêcher le phénomène de « désagglomération », en mettant les gouttes pendantes à la glacière ; et, nous savons que, dans ces conditions, si les Trypanosomes conservent longtemps leur vitalité, leur mobilité est diminuée.

A un autre point de vue, on se rend compte que, si notre manière d'interpréter le phénomène de désagglomération est exacte, son intensité est en raison inverse de la valeur agglutinante du sérum employé.

1. Les observations étaient faites en gouttes pendantes, à 15° en moyenne.

Vitalité et virulence des Trypanosomes agglomérés. — Nous avons fait un très grand nombre d'expériences à cet égard, surtout avec les sérums spécifiques dont nous étudiions toujours avec soin les propriétés agglomérantes avant de les utiliser dans un but préventif; comme témoin, nous employions le même sang à Trypanosomes mélangé soit à de l'eau physiologique, soit à du sérum de rat neuf. Les mélanges étaient conservés soit en gouttes pendantes à la température du laboratoire (15° environ), soit en tubes fermés au coton, à la glacière.

Toujours, les mélanges agglutinés ont conservé aussi longtemps des Trypanosomes vivants que les autres; ces Trypanosomes se sont montrés aussi infectieux.

Une remarque doit néanmoins être faite; nous avons déjà dit que, dans le cas d'amas secondaires *persistants*, les Trypanosomes du centre de l'amas meurent assez vite. On ne saurait voir là une exception à la règle : les Trypanosomes meurent comme conséquence *secondaire* de l'agglomération, par le fait qu'au centre des amas, ils se trouvent dans des conditions tout à fait défavorables pour leurs échanges vitaux. La survie des Trypanosomes périphériques plaide en faveur de cette interprétation.

Examinons maintenant les particularités de l'agglomération dans les différents cas où elle se produit.

Agglutinines spécifiques. — Le sérum des rats neufs [rats blancs ou pie (*Mus rattus*), rats d'égout (*Mus decumanus*)] n'est pas agglutinant[1].

Il acquiert, par suite d'inoculations successives de sang à Trypanosomes, des propriétés agglutinantes d'autant plus développées que l'immunisation a été poussée plus loin. Mais, déjà après une seule inoculation et lorsque l'infection est terminée, il a un pouvoir agglomérant très net. Même le sérum d'un rat en cours d'infection se montre légèrement agglutinant et quelquefois, comme nous le verrons, pour ses propres Trypanosomes.

Après 5 à 10 inoculations intrapéritonéales, les rats ont un sérum dont le titre agglutinant est variable de 5 à 50, c'est-à-dire qu'à une certaine quantité de sang défibriné, il faut ajouter,

1. Nous avons même observé qu'en ajoutant à du sang défibriné à Trypanosomes du sérum de rat, au lieu d'eau physiologique, ses Trypanosomes ne s'agglutinaient pas à la glacière.

suivant les cas, au moins 1/5 ou 1/50 de son volume de sérum, pour déterminer l'agglutination de ses Trypanosomes. En employant ces doses limites, on produit des agglutinations qui se défont presque complètement. Mais, à doses plus fortes, on a généralement des agglutinations persistantes, au moins en majorité; cela est toujours vrai quand le titre agglutinant d'un sérum est supérieur à 10.

Avec les sérums bien agglutinants, employés à doses au moins doubles de celle limite, on a généralement des amas secondaires. Enfin, nous avons déjà fait allusion aux cas de rats qui avaient reçu plus de 10 inoculations dont le sérum, à 1/20 (il n'a pas été essayé à dose plus faible), donnait des agglutinations persistantes et qui, à doses plus fortes, se montrait très nettement paralysant. L'un de ces rats qui, en 7 mois, avait reçu 13 inoculations, avait un sérum qui, à 1 sur 10, était assez paralysant pour qu'il ne se formât plus de rosaces de Trypanosomes agglutinés.

La propriété paralysante des sérums spécifiques se développe donc très tardivement au cours de l'immunisation, contrairement à ce qui a lieu pour les sérums antibactériens où elle est toujours liée à la propriété agglutinante.

Les sérums spécifiques renferment une véritable agglutinine. Le chauffage à 55-58°, pendant une 1/2 heure ou 3/4 d'heure, n'abaisse pas leur titre agglutinant: mais les agglutinations produites par ces sérums chauffés ne sont généralement pas aussi belles ni aussi persistantes que celles des sérums non chauffés. A la température de 63-65°[1], maintenue pendant une demi-heure, toute trace de propriété agglutinante a disparu.

Le sérum d'un cobaye, qui avait reçu plusieurs injections de sang à Trypanosomes, s'est montré faiblement agglutinant; celui de cobaye neuf ne l'est pas du tout.

Agglutinines de divers sérums neufs. — Les sérums de cobaye, de pigeon et de grenouille ne manifestent pas de propriétés agglutinantes pour les Trypanosomes de sang de rat défibriné.

Ceux de mouton, de chien et de lapin sont peu agglutinants; il faut les employer à égalité de volume avec le sang à Trypano-

1. Le sérum de rat se coagule à cette température; il faut donc le mélanger à son volume d'eau physiologique; on obtient, après chauffage, un liquide très opalescent.

somes pour obtenir des résultats nets. Mais, même dans ces conditions, l'agglutination n'est jamais totale et l'on a généralement des rosaces d'un petit nombre d'éléments. Avec le sérum de lapin, la désagglutination est à peu près totale au bout de quelques heures. Les agglomérations persistent mieux avec les sérums de mouton et de chien; avec ce dernier même, on a quelques amas secondaires.

Les sérums de poule et de cheval sont beaucoup plus agglutinants que les précédents. Leur titre est compris entre 2 et 10; 1 goutte mélangée à 1 ou même 2 gouttes de sang à Trypanosomes détermine une agglomération complète des Trypanosomes; les rosaces sont formées d'un très grand nombre d'éléments, et on a d'énormes amas secondaires, au moins aussi gros que dans le cas des sérums spécifiques. Mais, avec ces sérums normaux, la désagglutination se produit toujours plus ou moins complètement.

L'agglutinine de ces sérums est influencée par la température, exactement comme celle des sérums spécifiques.

Il y a un certain parallélisme entre les pouvoirs agglutinants des sérums étrangers vis-à-vis des hématies du rat et vis-à-vis des Trypanosomes. Ainsi, parmi les sérums de mammifères étudiés, celui de cheval est le plus actif dans les deux cas. Celui de poule est très actif dans les deux cas, celui de pigeon pas du tout. Mais le titre agglutinant vis-à-vis des hématies est toujours beaucoup plus élevé que vis-à-vis des Trypanosomes; ainsi, pour un sérum de poule, le premier atteignait 20, tandis que le second était compris entre 4 et 5.

Dans ces divers sérums, les Trypanosomes, agglutinés ou non, se conservent longtemps. Les sérums de poule et de pigeon nous ont paru jouir de propriétés remarquables à cet égard (voir chapitre I).

Pouvoir agglutissant des humeurs de rats infectés pour leurs propres Trypanosomes. — Ce phénomène se manifeste surtout quand on examine, en gouttes pendantes, les humeurs péritonéales de rats immunisés activement ou passivement et injectés de Trypanosomes; mais on n'obtient ainsi que de petites rosaces qui persistent ou non.

Quelquefois, en examinant du sang d'un rat en cours d'infection, on constate chez les Trypanosomes, entre lame et lamelle,

une tendance manifeste à se grouper[1] et quelquefois on obtient de véritables rosaces; mais ces amas ne sont pas persistants.

Historique. — Ces phénomènes d'agglutination des Trypanosomes paraissent avoir été vus, pour la première fois, par Chalachnikow, dans ses essais de culture de *Trypanosoma Lewisi* dans le sérum de chien; ses prétendues formes de multiplication (pl. VII, fig. 27-28) sont incontestablement des rosaces d'agglutination.

Il est singulier que Rabinowitsch et Kempner qui ont, les premiers, préparé un sérum spécifique, déclarent que leur sérum n'avait aucune propriété agglutinante. Nous ne nous expliquons pas cette différence entre leurs résultats et les nôtres.

Dans les mémoires publiés sur le Surra et le Nagana, nous avons noté plusieurs allusions à des phénomènes que nous interprétons sans hésiter comme de l'agglutination.

Enfin, Bütschli[2], en étudiant les Flagellés du tube digestif d'un Nématode libre (*Trilobus gracilis*), a observé leur réunion en rosaces, toutes les extrémités postérieures convergeant au centre: il s'agit encore là évidemment de phénomènes d'agglutination[3].

***

En résumé, le fait qui domine les phénomènes d'agglomération des Trypanosomes et qui leur imprime un caractère si spécial, c'est que les Trypanosomes restent mobiles. Au point de vue de la conception générale du phénomène d'agglutination, il prouve que, quand il s'agit d'éléments mobiles, l'immobilisation n'est pas nécessairement le prodrome de l'agglomération; ou, si l'on veut s'exprimer autrement, que les substances paralysante et agglutinante sont différentes. Certains faits tendent à faire soupçonner cette dualité en ce qui regarde les bactéries mobiles; le cas des Trypanosomes la met nettement en évidence.

Dans le cours de l'immunisation, la propriété agglutinante des sérums apparaît rapidement (même en cours d'infection);

1. Si l'on n'était pas prévenu, on pourrait songer à un prodrome de conjugaisons. C'est ainsi que Stassano (*Société de Biologie*, janvier 1901) a interprété le phénomène.

2. Bütschli, *Zeitschr. f. wiss. Zoologie*, t. XXX, 1878, p. 216.

3. Tout récemment, Doflein a interprété ces figures comme stades de multiplication.

au contraire, la propriété paralysante ne se montre que chez des animaux hyperimmunisés et nous verrons plus loin que la propriété préventive la précède de longtemps.

On connaissait de nombreux sérums spécifiques agglutinants pour des bactéries, pour des cellules d'animaux supérieurs (hématies, etc.); nos recherches, dont le résumé a été publié en novembre 1900, ont ajouté à cette liste les animalcules inférieurs ; celles toutes récentes de divers savants, les levûres.

V. — Marche de l'infection chez les rats et les cobayes.

Infection des rats. — Le mémoire de Rabinowitsch et Kempner renferme des renseignements très précis sur les résultats d'inoculation de sang frais à Trypanosomes à des rats indemnes. Nous serons donc très brefs sur ce sujet que nous avons déjà effleuré dans le chapitre I.

Rabinowitsch et Kempner ont montré que l'injection intrapéritonéale constituait une méthode de choix; en fait, ils n'ont eu que 2 échecs sur une cinquantaine de rats domestiques. Sur une centaine de rats blancs ou pie, nous n'avons eu que 3 échecs. De ces 3 rats, 2 se sont montrés absolument réfractaires; l'un a reçu cinq inoculations, l'autre onze ; aucune d'elles n'a été suivie d'apparition de Trypanosomes dans le sang. Un troisième rat a succombé 9 jours après une inoculation, sans avoir montré d'infection sanguine [1]. Enfin, dans un quatrième cas, une première inoculation n'a donné aucun résultat : mais une deuxième a déterminé une infection très intense et de longue durée.

L'infection des rats domestiques, par voie péritonéale, comprend trois périodes bien distinctes. Une *première* de 3-4 jours où les Trypanosomes se multiplient activement dans la cavité abdominale ; la multiplication ne commence guère que 24 ou 36 heures après l'injection; elle atteint son maximum pendant le troisième jour et cesse bientôt ; les Trypanosomes disparaissent alors complètement du péritoine et n'y réapparaissent à aucune période de l'infection. L'importance de cette première période a été signalée par Rabinowitsch et Kempner ; elle est très grande

1. Dans ces trois cas, il ne s'agissait pas de femelles pleines, comme pour les rats réfractaires de Rabinowitsch et Kempner. Toutes les femelles pleines que nous avons inoculées se sont montrées sensibles.

au point de vue de la diffusion du parasite. On trouve, dans le péritoine, à cette période, toutes les formes de multiplication que nous avons décrites dans la partie morphologique de ce travail ; les rosaces à petites formes dominent.

Le passage des Trypanosomes dans le système sanguin est plus ou moins rapide suivant les cas ; Rabinowitsch et Kempner, Wasielewski et Senn ne l'indiquent que du 3e au 7e jour, exceptionnellement au bout de un jour. Le passage dans les premières 24 heures nous a semblé, au contraire, être le cas le plus fréquent; dans des cas non rares où l'examen du sang a été fait 5 ou 6 heures après l'inoculation, une quantité notable de Trypanosomes étaient déjà dans l'appareil circulatoire. Mais, à côté de ces passages rapides, il y a des cas où, à l'examen microscopique, on ne découvre de Trypanosomes dans le sang que 2 jours, 3 jours et même plus (jusqu'à 7 jours) après l'injection ; il s'agit alors généralement de vieux rats. Le passage rapide dans la circulation a lieu aussi pour la moitié environ de ces rats; mais elle est surtout caractéristique des jeunes rats de 30 à 100 grammes, dont nous avons beaucoup usé.

C'est sans doute par une question de poids des rats mis en expérience que s'expliquent, en partie, les différences des résultats de nos prédécesseurs et des nôtres. Quant à l'influence du nombre de Trypanosomes inoculés sur la rapidité de l'infection sanguine, elle est faible, pourvu que la quantité de sang inoculé soit supérieure à 1/50 de centimètre cube.

Les premiers Trypanosomes qui apparaissent dans le sang sont des formes adultes minces: ce sont évidemment des Trypanosomes inoculés. Mais rapidement (au bout de 48 heures fréquemment) se montrent des formes renflées se préparant à la reproduction. Ce n'est pourtant généralement que dans la 4e journée que les Trypanosomes sont nombreux dans le sang, et que les formes de reproduction y abondent (*deuxième période*). La reproduction intrasanguine succède donc à la reproduction intrapéritonéale ; mais il y a toujours un nombre relativement moindre de formes de multiplication dans le sang que dans le péritoine, et cela est particulièrement vrai pour les rosaces à petites formes.

On observe généralement des Trypanosomes en voie de reproduction dans le sang jusqu'à la fin du 8e jour, quelquefois

même un peu plus tard, surtout si l'apparition des flagellés y a été tardive. A partir de ce moment et jusqu'à la fin de l'infection, on ne trouve plus dans l'appareil circulatoire que des formes adultes minces; nous n'y avons plus jamais observé de formes de multiplication. C'est la *troisième période*, qui dure un temps extrêmement variable.

En résumé, nous avons trois périodes : 1° multiplication péritonéale; 2° multiplication sanguine; 3° période d'état.

Ce tableau de l'infection d'un rat ne s'applique bien qu'aux cas, nombreux d'ailleurs, où le sang renferme longtemps de très nombreux Trypanosomes : 1 pour 2-3 hématies, quelquefois même, mais exceptionnellement, 1 et 2 flagellés pour 1 globule rouge. L'infection dure alors au moins une vingtaine de jours, généralement deux mois, parfois 4 mois et plus. Quelquefois, elle cesse brusquement; d'autres fois, la disparition des Trypanosomes est graduelle, elle peut durer un mois. Rarement, lorsque les Trypanosomes sont en décroissance, il y a de nouvelles poussées.

Mais l'infection peut être légère et ceci se présente assez fréquemment avec les vieux rats; les Trypanosomes apparaissent assez tardivement dans le sang, ils ne deviennent jamais nombreux et ils disparaissent au bout de 2 à 8-10 jours. Ces rats n'en acquièrent pas moins, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, l'immunité active.

Les inoculations sous-cutanées donnent fréquemment aussi un résultat positif; mais la période de multiplication intrapéritonéale est supprimée; l'infection du sang est aussi rapide, mais moins vite intense que dans le cas des infections par inoculation dans le péritoine.

Les quelques expériences que nous avons pu faire avec les rats d'égout nous permettent d'affirmer que la marche de l'infection est identique à celle que nous venons de décrire.

Infection avec le sang conservé. — Si le sang conservé à la glacière contient encore des Trypanosomes mobiles assez nombreux, le temps qui s'écoule entre le moment de l'inoculation et le début de l'infection sanguine n'est pas sensiblement allongé. Mais quand on opère avec du sang conservé depuis longtemps et où, à l'examen microscopique, on ne distingue que peu de Trypanosomes ou plus du tout, l'incubation est plus longue.

Du sang conservé 47 jours à la glacière et où les Trypanosomes étaien rares, a donné une infection assez longue, mais peu intense, à un rat (sur 2 inoculés), mais les Trypanosomes n'ont apparu dans le sang qu'entre le 6e et le 9e jour. Le même sang, conservé à la glacière 51 jours et ne montrant plus de Trypanosomes au microscope, a donné à un rat une infection semblable; apparition des Trypanosomes dans le sang au bout de 7 jours.

Des expériences de contrôle faites avec des traces de sang frais nous ont prouvé que le retard dans l'incubation ne tenait pas uniquement à la petite quantité de parasites inoculés; elle doit tenir surtout à leur état.

Les infections obtenues avec le sang conservé sont aussi intenses que celles réalisées avec le sang frais. Ainsi, la plus longue infection que nous ayons obtenue a eu pour point de départ l'inoculation d'un sang conservé 30 jours à la glacière; la période d'incubation a été de 5 jours; l'infection a duré 5 mois et demi (décroissance au bout de 3 mois).

Rappelons enfin que les Trypanosomes conservent leur pouvoir infectieux aussi bien dans les sérums agglutinants, spécifiques ou neufs, que dans l'eau physiologique.

Symptômes morbides chez les rats infectés. — Tout le monde s'accorde à reconnaître que l'infection à Trypanosomes du rat, malgré son intensité, n'occasionne guère des ymptômes morbides. D'après Rabinowitsch et Kempner, il n'y a pas de fièvre. L'abattement ne se manifeste que dans les 24 heures qui suivent l'injection. Dans un lot de jeunes rats où l'infection a été particulièrement intense (durant plusieurs jours, 3 Trypanosomes pour 1 hématie), il y a eu arrêt d'augmentation de poids et même baisse pendant la première semaine (des rats du même lot, immunisés passivement, continuaient à augmenter); mais tout est bientôt rentré dans l'ordre.

A l'autopsie, nous avons noté, comme nos prédécesseurs, l'hypertrophie de la rate. Lingard a d'ailleurs donné des chiffres précis : le poids est doublé en moyenne.

En résumé, les rats supportent parfaitement l'infection.

Infection des cobayes. — Dans leur mémoire sur le Nagana, Kanthack, Durham et Blandford[1] déclarent que le Trypanosome des rats se rencontre, en petite quantité, du 5e au 7e jour

1. *Proceedings of the R. Society*, t. LXIV, 1898, et *Hygienische Rundschau*, 1898, n° 24.

après l'inoculation, dans le sang des cobayes. Mais, pour pouvoir affirmer qu'il y a réellement infection, il fallait observer une multiplication du parasite dans le corps du cobaye. Nous l'avons notée dans la cavité péritonale du 2e au 5e jour après l'inoculation[1]; mais elle se présente rarement dans le sang et c'est sans doute ce qui explique que l'infection n'est jamais de longue durée.

Nous renvoyons au chapitre III pour les changements morphologiques que *Tryp. Lewisi* éprouve dans l'organisme du cobaye. Les parasites apparaissent dans le sang dans les 24 premières heures qui suivent l'inoculation; ils s'y maintiennent de 5 à 7 jours, avec leur grain réfringent postérieur, augmentent d'abord de nombre, jusqu'à atteindre 1/20 ou 1/50 des hématies, puis deviennent plus rares et enfin disparaissent. La disparition des nombreux parasites du péritoine, comprenant en majorité des formes de multiplication, précède généralement de 24 heures celle des Trypanosomes du sang; elle est assez brusque et elle nous a paru coïncider avec un afflux leucocytaire. L'exsudat péritonéal devient plus abondant. Nous avons vu, dans ces conditions, des Trypanosomes en train d'être englobés par des phagocytes. Le Trypanosome est dans l'axe d'une sorte de cratère très aigu formé par les prolongements du leucocyte; la partie de son corps, encore libre, montre une très grande mobilité.

Dans les préparations colorées, nous avons observé, avec la plus grande netteté, toutes les phases de la digestion des Trypanosomes par les mononucléaires du cobaye, les seuls leucocytes qui paraissent les englober. Les figures 10-12 de la planche XI donnent une idée de ce processus. Le Trypanosome est d'abord ramassé en boule dans une vacuole; son protoplasme, son noyau et son centrosome sont parfaitement intacts; seul, le flagelle se colore moins bien (fig. 10). Puis, la dissolution du protoplasme commence, le noyau et le centrosome étant encore très reconnaissables (fig. 11). Ce doit être ensuite le tour du centrosome, car on rencontre fréquemment des leucocytes tels que celui de la figure 12 qui ne renferment qu'un noyau de

1. Toutes nos injections ont été faites dans le péritoine. Elles ont porté sur des cobayes de 100 à 400 grammes. Nous inoculions au moins 1 c.c. de sang riche en Trypanosomes. Dans ces conditions, on a d'assez nombreux échecs; mais plus de la moitié des cobayes montrent l'infection que nous allons décrire.

Trypanosome. L'aspect de ce noyau prouve qu'il est en voie de digestion : on n'y distingue que des grains de chromatine; le suc nucléaire a disparu sans doute par suite de la destruction de la membrane. La destruction des Trypanosomes chez le cobaye s'accomplit donc par le processus phagocytaire : les Trypanosomes, englobés vivants et très mobiles, sont digérés par les mononucléaires du cobaye.

VI. — Immunité active. — Son mécanisme.

Dans le court passage de leur mémoire qui établit les caractères différentiels de *Trypanosoma Lewisi* (qu'ils appellent *Tr. sanguinis*) et du parasite du Nagana, Kanthack, Durham et Blandford déclarent que des rats qui ont eu une première infection sont réfractaires à une seconde inoculation. C'est donc à ces savants qu'il faut rapporter le mérite d'avoir établi l'existence d'une immunité active vis-à-vis d'un Trypanosome. Mais ce sont Rabinowitsch et Kempner qui ont attiré l'attention sur ce fait et mis en évidence son importance. Jamais, disent-ils, un rat qui est débarrassé d'une première infection n'en contracte une nouvelle, quelle que soit la dose de sang à Trypanosomes inoculée dans le péritoine. Nous pouvons confirmer cette règle qui pourtant souffre quelques exceptions.

Ainsi, sur une trentaine de rats que nous avons suivis avec soin à cet égard, deux seulement ont montré une nouvelle infection à la suite d'une deuxième inoculation de sang à Trypanosomes. Peut-être conviendrait-il d'ajouter à ces deux rats celui qui n'a présenté aucune infection à la suite d'une première inoculation, et une assez intense, d'au moins 2 mois 1/2, à une seconde inoculation. Enfin, un de nos rats qui avait montré une infection très intense de 3 mois 1/2 à une 1re inoculation (sang accompagné de 1/2 c.c. de sérum spécifique peu actif), a encore montré, à une 2e inoculation, une infection sanguine légère de 20 jours environ et, à une 4e, une infection assez intense. En revanche, nous avons déjà, dans le chapitre précédent, signalé deux rats qui, à la 1re inoculation comme aux suivantes, se sont montrés complètement réfractaires.

Tous ces faits exceptionnels n'empêchent pas la généralité de la loi posée par Rabinowitsch et Kempner. Une première infection, fût-elle de deux jours seulement et caractérisée par la présence de très rares Trypanosomes dans le sang, confère aux rats l'immunité active.

Les rats issus de femelles immunisées ont-ils l'immunité? — Une femelle immunisée a eu 2 portées successives : l'unique survivant de la 1re portée a résisté à toutes les inoculations; en revanche, les 8 rats de la seconde portée se sont montrés aussi sensibles que des rats neufs. Tous les petits de deux autres femelles se sont montrés sensibles. Enfin, de deux petits d'une 4e femelle immune, l'un a résisté à une 1re inoculation, mais a pris, à la seconde, une infection très intense; l'autre a été sensible à la 1re inoculation. Ces quelques faits indiquent que l'immunisation par voie placentaire et par lactation est exceptionnelle, si elle existe réellement.

Nous avons constaté également que la substance agglutinante ne traverse pas le filtre placentaire.

L'*immunité du cobaye*, après une 1re infection, ne paraît pas s'acquérir aussi facilement que celle du rat, ni, en tous cas, être aussi solide. Ainsi, sur 4 cobayes expérimentés, 2 ont supporté les inoculations, autres que la première, sans montrer à nouveau des Trypanosomes dans le sang; mais deux autres ont eu une nouvelle infection à la 3e inoculation. Ces observations sont trop peu nombreuses pour qu'il soit possible de conclure.

Mécanisme de l'immunité active des rats. — Que deviennent les Trypanosomes injectés dans la cavité abdominale d'un rat immun? Nous nous sommes posé cette question dont nos prédécesseurs ne paraissent pas s'être préoccupés. Nous avons d'abord constaté que les Trypanosomes n'apparaissent que très exceptionnellement dans le système circulatoire et que, dans ces cas, leur présence y est tout à fait passagère et qu'ils y sont en très petit nombre. *La destruction des Trypanosomes a donc lieu dans la cavité péritonéale même.*

Le temps au bout duquel tous ces flagellés ont disparu est variable. Chez les gros rats qui ont déjà reçu plusieurs inoculations, il suffit souvent de une heure et même moins pour la destruction complète de tous les Trypanosomes contenus dans 1/2 ou 1 c. c. d'un sang très riche (1 Trypanosome pour 1 à 3 hématies).

Quel est le mécanisme de cette destruction? Pour nous en rendre compte, nous retirions de la cavité péritonéale des rats, au bout de temps variables, de l'exsudat que nous examinions en gouttes pendantes. Jusqu'à disparition complète, on constate

que tous les Trypanosomes de la cavité péritonéale gardent leur mobilité, qu'ils conservent leur forme et restent bien isolés. Pour faire cette dernière observation, il est indispensable d'observer la goutte aussitôt après qu'elle a été retirée du péritoine : car, en quelques minutes, les Trypanosomes forment de petits amas ; les humeurs des rats immunisés sont en effet agglomérantes mais, dans les conditions de notre observation, le phénomène est toujours de peu d'intensité (voir chapitre IV).

L'exsudat retiré contient un grand nombre de leucocytes, environ deux tiers de polynucléaires et un tiers de mononucléaires. On est frappé de ce fait que les Trypanosomes sont souvent comme collés par une de leurs extrémités à un leucocyte. Enfin, on observe fréquemment des Trypanosomes en train d'être englobés par les leucocytes : le leucocyte envoie des prolongements qui forment une sorte de tronc de cône très aigu, dans l'axe duquel se trouve une partie plus ou moins grande, soit antérieure, soit postérieure, du Trypanosome. La partie restée libre a conservé toute sa mobilité et, quand c'est le flagelle, il s'agite très vivement. *Les leucocytes des rats immunisés* (nous avons fait souvent la contre-épreuve avec des rats neufs) *englobent donc les Trypanosomes ayant tous leurs caractères de vitalité.*

Ces observations, faites au moment même où l'on retire l'exsudat du péritoine, peuvent être poursuivies sur la goutte pendante. Les englobements de Trypanosomes se continuent en effet sans interruption si l'on met la préparation sur la platine chauffante du microscope, et, après 1-2 heures d'arrêt, si l'on observe à 15-20°. A 37°, on se rend compte de la rapidité avec laquelle se fait l'englobement d'un Trypanosome ; il y a d'abord simple adhérence du parasite au globule et il arrive alors que très souvent le Trypanosome se dégage. Mais d'autres fois, c'est le leucocyte qui a le dessus ; il envoie des sortes de tentacules tout autour du Trypanosome ; celui-ci est alors ramené en quelques minutes vers la masse centrale du leucocyte et on le voit rapidement se déformer et se confondre dans la masse plus ou moins granuleuse du leucocyte où il est bientôt impossible de le distinguer (voir fig. 17, A-C, qui représente les étapes successives, à intervalles de 5 minutes, de l'englobement d'un Trypanosome par un leucocyte). — A 15-20°, les englobe-

ments se font de même, mais avec une beaucoup plus grande lenteur (les stades 17 A sont très fréquents; le cône peut être beaucoup plus allongé).

En somme, la destruction des Trypanosomes par les leucocytes est le seul mode que nous ayons observé dans les cas d'immunité active et nous n'hésitons pas à considérer ce processus comme le seul existant.

Nous avons voulu nous rendre compte, par des préparations colorées, de la façon dont s'effectue la digestion des Trypanosomes par les leucocytes. Nous n'avons pas été aussi heureux

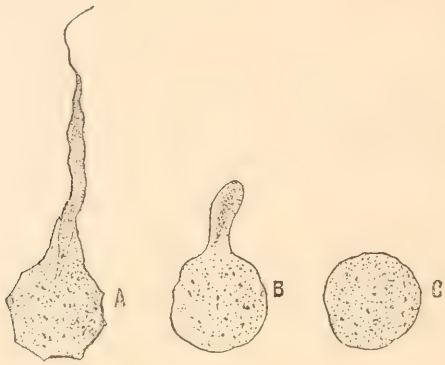


Fig. 17. La figure représente plusieurs phases de l'englobement d'un Trypanosome par un leucocyte dans l'exsudat péritonéal d'un rat, 4 heures après l'injection du sang à Trypanosomes dans le péritoine de ce rat. — A. La partie non englobée du Trypanosome est animée encore de mouvements très nets quoique ralentis; la partie déjà englobée est peu distincte. — B. Mêmes éléments dessinés au bout de 5 minutes; le Trypanosome ne forme plus qu'un prolongement dont la nature serait facile à méconnaître si on n'avait pas saisi toutes les phases de l'englobement. — C. Mêmes éléments dessinés encore au bout de 5 minutes; le Trypanosome a été englobé complètement et le leucocyte a repris son aspect normal.

qu'avec les exsudats péritonéaux des cobayes. Il est probable que la destruction des Trypanosomes se fait très vite [1]; déjà, les observations d'englobement *in vitro* prouvent que le parasite est de suite déformé; sans doute, son protoplasme est rapide-

1. En ajoutant du bleu de méthylène ou mieux du rouge neutre à une goutte pendante, on est frappé du nombre considérable des inclusions leucocytaire qui se colorent; mais ce n'est que deux ou trois fois seulement que nous avons vu des Trypanosomes englobés et encore reconnaissables par leur forme se colorer dans les leucocytes par le rouge neutre.

ment digéré et il ne reste plus que le noyau et le centrosome. On observe en effet fréquemment dans les leucocytes, particulièrement dans les mononucléaires, des boules de chromatine, souvent une grosse associée à une petite, que nous interprétons avec réserves comme provenant d'un Trypanosome englobé.

Les meilleurs résultats que nous ayons obtenus l'ont été en réalisant de la phagocytose *in vitro*, en mélangeant en goutte pendante de l'exsudat (obtenu en injectant 24 heures avant, dans le péritoine, du bouillon frais) d'un rat immun et du sang à Trypanosomes; en faisant des frottis quelques heures plus tard nous avons observé ainsi quelques débuts d'englobement (voir Pl. XI, fig. 13-14).

La façon dont les Trypanosomes sont englobés par les leucocytes du rat rappelle surtout les processus décrits et figurés par Sawtchenko pour l'incorporation des Spirilles de la fièvre récurrente par les leucocytes du cobaye [1]. Mais, dans ce cas, on retrouve encore longtemps les Spirilles englobés dans de larges vacuoles où la coloration *intra vitam* par le bleu de méthylène les met facilement en évidence. — Ces particularités sont bien en rapport avec les différences de constitution des Trypanosomes et des Spirilles.

VIII. — Immunité passive. — Valeur préventive du sérum des rats immunisés. — Essais de traitement. — Mécanisme de l'immunité passive. — Suites d'immunité passive.

C'est à Rabinowitsch et Kempner que l'on doit cette importante découverte que le sérum des rats qui ont reçu plusieurs injections de sang à Trypanosomes est doué de propriétés préventives. Dans leurs expériences, 1 c. c. de sérum injecté à des rats soit en même temps que du sang à Trypanosomes, soit 24 heures avant, soit 24 heures après, les préservait de toute infection, alors que les témoins prenaient une infection de courte durée (4 à 7 jours). Les sérums de rat neuf et de chien se sont montrés dépourvus de toute propriété préventive. Il en a été de même des émulsions de cerveau, de rate, de moelle des os et de foie des rats dont le sérum était préventif. Cette dernière constatation est intéressante; elle crée une forte

1. Sawtchenko, *Archives russes de pathologie et de bactériologie* (Podwyssotzky), 1900.

présomption en faveur de l'origine leucocytaire de la substance préventive; nous avons vu, en effet, que les Trypanosomes sont détruits et digérés par les leucocytes.

Quant au mécanisme de cette immunité passive, Rabinowitsch et Kempner émettent l'hypothèse tout à fait invraisemblable d'une action antitoxique. *Trypanosoma Lewisi*, si peu pathogène, est certainement le dernier parasite pour lequel on songerait à une action toxique!

Nous avons repris les expériences de Rabinowitsch et Kempner et nous avons reconnu, comme eux, les propriétés préventives du sérum des rats immunisés contre le *Trypanosoma Lewisi*. Toutes nos expériences ont été faites avec de jeunes rats de 30 à 125 grammes. Avec ces rats, on a toujours des infections longues et intenses avec 3 périodes bien nettes pour l'évolution du parasite. On peut donc, avec la plus grande facilité, reconnaître la perturbation que jette dans cette évolution parasitaire l'introduction d'un sérum, alors même qu'il n'arrête pas toute infection.

Dans nos expériences de contrôle, nous avons employé, à la place du sérum spécifique, du sérum de divers animaux, rats neufs, mouton, lapin, cheval, poule. Dans la plupart de nos expériences, les sérums étaient mélangés, dans la seringue même, avec le sang à Trypanosomes, et le tout était injecté immédiatement dans la cavité péritonéale des rats. Employés à des doses variant de 0 c. c. 5 à 1 c. c. 3, les divers sérums neufs n'ont amené aucun changement dans la marche de l'infection.

Quant aux sérums spécifiques, leur action a été variable avec le rat dont ils provenaient, et surtout avec le nombre d'injections qu'avait reçues ce rat. Généralement, le sérum de rats, ayant reçu au moins 5 inoculations de sang à Trypanosomes, s'est montré actif à la dose de 1/2 c. c. (injecté en mélange avec les Trypanosomes dans la cavité péritonéale); dans ces conditions, les Trypanosomes n'apparaissaient pas dans la circulation et ils disparaissaient du péritoine au bout d'un temps variable de quelques heures à 48 heures, sans qu'il s'y produisît le moindre développement. Notre sérum le plus actif provenait de rats dont l'un (rat R) avait reçu 13 inoculations; l'autre (rat R'), 10 inoculations. Le tableau suivant donne les résultats obtenus avec ces sérums :

Nos des rats.	POIDS	DÉTAIL des injections faites le 3 fév.	Examen du sang.	EXAMEN du contenu péritonéal.
1	48	Péritoine : 0cmc,5 sérum rat R + 0cmc,2 sang dilué à trypanosomes.	Toujours négatif.	Plus de trypanosomes 3 h. 1/2 après l'injection.
2	57	Péritoine : 0,25 sérum rat R + 0,2 sang dilué à trypanosomes.	idem	3 h. 3/4 après l'injection, vu seulement 1 trypanosome libre et 1 en voie d'englobement par 1 leucocyte.
3	40	Péritoine : 0,10 sérum rat R + 0,2 sang dilué à trypanosomes.	Les 4, 6 et 7 février, trypanosomes extrêmement rares.	4 h. après l'injection, trypanosomes encore assez nombreux, bien mobiles; après 24 h., rares.
4	55	Péritoine : 0,35 sérum rat R chauffé 35′ à 58°,5 + 0,2 sang dilué à trypanosomes.	Le 9 février trypanosomes non rares.	4 h. après l'injection, vu seulement 1 trypanosome.
5	50	Péritoine : 0,55 sérum rat R chauffé 30′ à 63°,5 + 0,2 sang dilué à trypanosomes.	Le 6 février vu 1 trypanosome.	3 h. 50 après l'injection, trypanosomes assez rares, isolés, bien mobiles. Plus rien 24 h. après.
6	59	Péritoine : 0,50 sérum rat R′ + 0,20 sang à trypanosomes.	Toujours négatif.	4 h. après l'inoculation, trypanosomes rares : vu un englobement.
7	52	Péritoine : 0,2 sang à trypanosomes; en même temps, *sous la peau*, 0,50 sérum rat R′.	Du 5 au 9 février, trypanosomes non rares.	4 h. 20 après l'inoculation, trypanosomes très nombreux, bien mobiles : 4 et 5 février, trypanosomes nombreux.
8	62	Péritoine : 0.30 sérum rat R′ + 0,20 sang à trypanosomes.	Toujours négatif.	4 h. 1/2 après l'injection, trypanosomes assez nombreux, il en persiste encore quelques-uns 24 h. après.
9	59	Péritoine : 0,20 sang à trypanosomes. (Témoin.)	Infection moins de 5 h. après l'inoculation devient rapidement très intense.	Culture abondante.
10	44	Péritoine : 0,20 sang à trypanosomes. (Témoin.)	idem	idem
11	57	Péritoine : 0,20 sang à trypanosomes; *24 h. après*, sous la peau, 1 c. c. sérum mélangé rats R et R′.	Trypanosomes non rares le 4, rares le 5, extrêmement rares le 6, puis 0.	Trypanosomes très nombreux le 4; peu nombreux le 5.

Nous avons donc eu un sérum actif, *en mélange*, à la dose de 0 c. c. 1; mais c'était évidemment la dose minima.

Les faits de notre tableau, corroborés par plusieurs autres expériences, comportent plusieurs conclusions que nous allons examiner.

Action de la température sur les propriétés préventives du sérum. — Chauffé 1/2 heure ou 3/4 d'heure à 58° et même à 64°, le sérum conserve encore des propriétés préventives (rats 4 et 5). Mais on remarquera que nous avons donné d'assez fortes doses et que la destruction des Trypanosomes a été moins rapide que dans le cas du rat 2. Le sérum a donc perdu, aux températures de 58°-64°, une partie de son action. D'autres expériences nous permettent de confirmer cette donnée et de la préciser. Ainsi, nous pouvons évaluer à la moitié environ de ce qu'elle était avant, la force d'un sérum chauffé à 55-58°; à 64°, cette force est encore nettement moindre [1].

Action du sérum non mélangé au virus. — Le sérum agit quand il est injecté *sous la peau*, en même temps que les Trypanosomes sont injectés dans le *péritoine* (rat 7); mais, dans ces conditions, malgré la dose employée, le résultat est lent et on n'évite pas une légère infection. — Injecté 24 heures après les Trypanosomes (rat 11), le sérum a réussi à enrayer une infection commençante; il est vrai que nous l'avons employé à dose massive (1 c. c.); la disparition des Trypanosomes n'a pas non plus été immédiate. — Des expériences antérieures nous avaient montré, qu'inoculé 24 heures *avant* les Trypanosomes, le sérum empêche l'infection, mais à condition encore d'employer des doses un peu plus fortes qu'en mélange.

Dans des expériences postérieures, nous avons employé le sérum en injection *intrapéritonéale* au lieu de *sous-cutanée*, et à la dose de 1 c. c., 24 et 48 heures *après* le début de l'infection; dans tous ces cas, en 24 heures, l'infection sanguine était enrayée; quelquefois pourtant, il y avait une poussée ultérieure très passagère.

On pourrait considérer ces derniers résultats comme des guérisons plutôt que comme des préventions; car, au bout de 48 heures surtout, les Trypanosomes étaient déjà nombreux

1. Comme nous l'avons déjà fait remarquer, le sérum, avant d'être chauffé à 64°, doit être dilué dans son volume d'eau physiologique.

dans le sang et en voie de multiplication abondante dans le péritoine.

Essais de traitement. — Nous avons été moins heureux en essayant d'enrayer une infection à la période d'état. Rabinowitsch et Kempner ont dû échouer également, si l'on en juge par la phrase suivante (*op. cit.*, p. 282). « Dans le corps même des rats dont le sang contenait de nombreux parasites, le sérum injecté intrapéritonéalement dans le cours d'une semaine, n'a montré aucune propriété antiparasitaire. »

Nous avons agi sur des rats au 8e jour après l'infection (début de la 3e période), au 13e, au 34e, au 51e jours; tous avaient de nombreux Trypanosomes dans le sang; chez aucun, l'infection n'était dans la période de décroissance.

Certains rats ont reçu, en plusieurs injections, jusqu'à 4 c. c. de sérum de rats immunisés. Des témoins recevaient les mêmes doses de sérum de rats neufs.

Les résultats obtenus ont été très inconstants. Chez certains, le nombre des Trypanosomes diminuait dans le sang immédiatement après l'injection et les parasites disparaissaient en quelques jours; chez d'autres, il y avait une baisse *passagère* des Trypanosomes, suivant l'injection; entre lame et lamelle, les flagellés avaient des mouvements ralentis, quelquefois ils montraient une tendance à l'agglutination; mais ces phénomènes ne persistaient pas.

Enfin, chez la moitié au moins des rats traités, nous n'avons noté aucune action antiparasitaire, malgré l'injection de 4 c. c. de sérum de rats immunisés, dans quelques cas. L'action sur les témoins a toujours été nulle.

Il y a donc, dans certains cas, une légère action du sérum; mais nous n'avons pas pu agir à coup sûr, ni rapidement.

Mécanisme de l'immunité passive. — Nous avons vu, dans le chapitre IV, que *in vitro* le sérum spécifique est toujours agglutinant, rarement paralysant, jamais microbicide. En règle générale, il y a parallélisme entre les pouvoirs agglutinant et préventif des sérums; nos sérums paralysants se sont montrés les plus actifs préventivement.

Ces propriétés agglutinantes et paralysantes jouent-elles un

rôle dans l'immunité passive? On peut déjà en douter *a priori* si l'on remarque que :

1° La chaleur agit très inégalement sur les pouvoirs agglutinant et préventif ; le premier n'est sérieusement touché qu'au delà de 58°, mais il a complètement disparu à 64° ; le second, quoique déjà réduit au moins de moitié à 55°, persiste encore en partie à 64° ;

2° Des sérums neufs très agglutinants (poule, cheval) ne sont nullement anti-infectieux, alors que le sérum spécifique chauffé à 64°, c'est-à-dire dépourvu de toutes propriétés agglutinantes, est encore préventif.

Mais l'étude détaillée de ce qui se passe dans la cavité péritonéale va prouver que l'immunité passive n'est nullement d'ordre humoral, mais encore d'ordre cellulaire. En retirant de l'exsudat à des heures variées depuis le moment de l'injection jusqu'à celui de la disparition complète des Trypanosomes, l'examinant partie en gouttes pendantes, partie en préparations fixées et colorées, on constate les faits suivants.

Les Trypanosomes dans la cavité péritonéale restent toujours très mobiles; jamais on n'en voit d'immobiles, ni d'altérés d'une façon quelconque. Le seul phénomène que l'on observe en goutte pendante est une légère agglutination des Trypanosomes, ce qui n'a rien d'étonnant si l'on songe que le sérum injecté est très agglutinant. Mais cette agglutination, que l'on voit se produire sous le microscope, n'est pas comparable à celle que nous avons décrite dans notre chapitre IV, et de plus elle est toujours incomplète. Enfin, elle existe aussi développée dans les exsudats de rats injectés avec certains sérums neufs, nullement préventifs, tel que le sérum de mouton. *L'agglutination ne saurait jouer un rôle quelque peu important dans la défense de l'organisme contre les Trypanosomes.*

Il n'est pas rare de constater, au moment où l'on commence à examiner la goutte pendante, que la plupart des Trypanosomes, très mobiles, sont comme accolés aux leucocytes, et que quelques-uns sont en voie d'être englobés par les leucocytes. Et si l'on observe longtemps une goutte pendante, on peut assister à toutes les phases de l'englobement d'un parasite très mobile par un phagocyte. Les détails du processus sont identiques à ceux que nous avons décrits à propos de l'immunité active.

L'examen des préparations colorées est moins instructif ; comme dans les cas d'immunité active, la destruction des Trypanosomes doit être extrêmement rapide et l'on ne retrouve guère que des restes chromatiques (pl. XI, fig. 15), à la vérité très abondants, dans les leucocytes mononuléaires et aussi, quoique plus rarement, dans les polynuléaires de l'exsudat[1]. L'immunité passive est donc encore d'ordre phagocytaire. Dans l'immunité active, comme dans l'immunité passive, il paraît y avoir *stimulation leucocytaire*.

Suites d'immunité passive. — Les rats, qui ont évité l'infection à Trypanosomes, grâce au sérum préventif, ont-ils acquis une immunité solide ? Nous avons inoculé tous nos rats à immunité passive, dans la seconde semaine qui a suivi l'expérience, avec du sang à Trypanosomes. La moitié environ se sont montrés réfractaires ; les autres ont contracté une infection, mais elle a toujours été courte et légère.

De plus, nous avons noté, chez la plupart de ces rats, que les Trypanosomes du sang, au cours de l'infection, montrent, entre lame et lamelle, ou en goutte pendante, une tendance manifeste à l'agglutination ; quelquefois, il se forme des rosaces d'un petit nombre d'éléments. Nous en avons déjà parlé ailleurs. La substance agglutinante inoculée persiste donc plus longtemps dans les humeurs du rat que la substance préventive.

Ce phénomène n'est pas absolument spécial aux rats ayant eu l'immunité passive ; nous l'avons observé, quoique très rarement, chez des rats n'ayant jamais reçu de sérum.

Notons encore que les rats qui se sont montrés réfractaires à une deuxième inoculation sont presque tous ceux qui, à l'inoculation, sang à Trypanosomes + sérum préventif, avaient contracté une légère infection.

1. Deux tiers de polynucléaires, un tiers de mononucléaires.

EXPLICATION DES PLANCHES

Toutes les figures proviennent de préparations (sang ou exsudat péritonéal) colorées par le procédé bleu Borrel-éosine tannin.

PLANCHE XI

Fig. 1-9. — Evolution de *Trypanosoma Lewisi* chez le rat. G = 2,000 diamètres environ.

Fig. 1. — Forme adulte mince.

Fig. 2. — Forme renflée se préparant à la division.

Fig. 3. — Division du centrosome et de la base du flagelle.

Fig. 4. — La division en deux est presque terminée; l'un des deux individus porte le flagelle ancien, l'autre un court flagelle de nouvelle formation.

Fig. 5. — Stade de multiplication avec 4 éléments, 3 ont des flagelles nouveaux, le 4e porte le flagelle ancien.

Fig. 6. — Stade de multiplication du noyau et du centrosome, non encore accompagné de division du protoplasme; l'un des flagelles est plus gros que les autres.

Fig. 7. — Rosace complète de 10 petits éléments sur le point de se séparer.

Fig. 8. — Jeune forme libre.

Fig. 9. — Jeune forme en train de se dédoubler.

Fig. 10-15. — Englobement et digestion des Trypanosomes par les phagocytes — Gr. = 1,100 diamètres environ.

Fig. 10-12. — Trois phases de la digestion des Trypanosomes par les leucocytes mononucléaires de l'exsudat péritonéal du cobaye; deux de ces leucocytes ont également englobé des hématies de rat.

Fig. 13-14. — Deux phases de l'englobement de Trypanosomes par des leucocytes de l'exsudat péritonéal d'un rat ayant l'immunité active.

Fig. 15. — Boules chromatiques dans un leucocyte de rat : immunité passive.

PLANCHE XII

Fig. 1. — Union de deux Trypanosomes.

Fig. 2. — Agglomération primaire en rosace.

Fig. 3. — Agglomération secondaire.

ÉTUDES SUR LA PESTE BOVINE

PAR MM.

M. NICOLLE
Directeur de l'Institut Impérial
de bactériologie de Constantinople.

ADIL-BEY
Chef de Laboratoire.

DEUXIÈME MÉMOIRE

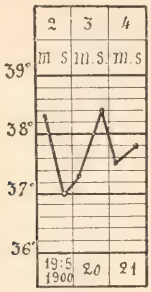
Nous nous proposons, dans le présent travail, de compléter certains chapitres de notre premier mémoire et d'aborder quelques questions nouvelles. Nous suivrons le même ordre que précédemment.

SYMPTOMES ET LÉSIONS DE LA MALADIE INOCULÉE

Il a été fait exclusivement usage, dans les expériences qui vont être relatées, d'un virus de passage entretenu sans interruption depuis 1897. Ce virus, tout en conservant son caractère de fixité, tue cependant les animaux plus rapidement qu'autrefois, au moins dans la majorité des cas. Les signes et lésions n'ont pas varié. Mentionnons, en passant, la réaction de la caillette, à laquelle certains auteurs attachent quelque importance. Nous l'avons recherchée systématiquement à l'autopsie, et nous avons pu nous assurer que la muqueuse, encore acide au début de la formation des érosions, devient ensuite neutre, puis alcaline.

Signalons, à propos des types cliniques, les formes incomplètes (rares) et la forme chez les jeunes animaux. Celle-ci (dont il a été fait mention dans le travail du Dr Réfik-bey et du vétérinaire Réfik-bey) se caractérise par l'absence de signes caractéristiques, par la faiblesse des membres (postérieurs principalement) pouvant aller jusqu'à la parésie, par sa courte durée et sa terminaison brusquement mortelle. C'est la seule forme de typhus contagieux qui soit apyrétique. A l'autopsie, on ne rencontre guère, comme lésion significative, que l'aspect cireux du foie. Voici un exemple très net de la forme chez les jeunes animaux (courbe n° 1). Tous les cas sont d'ailleurs pour ainsi dire calqués les uns sur les autres.

Il ne nous a été donné qu'une seule fois d'infecter une vache pleine et de rechercher si le fœtus était virulent. Il s'agissait d'un animal mort le neuvième jour, avec les signes et lésions classiques. L'utérus contenait un fœtus de $0^m,23$ de long. 1 gramme de pulpe cérébrale de celui-ci, recueillie aseptiquement (après



Courbe 1.

Animal 79-11. Race mixte (Crimée 9 Anatolie), 4 à 5 mois. Reçoit, le 18. V. 1900. 5 c. c. de virus. Meurt dans la nuit du 4e au 5e jour, sans autres signes que de la faiblesse du train postérieur. A l'autopsie, congestion de la caillette foie cireux. Le sang est virulent (il infecte l'animal 79-52).

cautérisation des téguments du crâne), puis émulsionnée dans 7 c.c. de bouillon, a été inoculé à un veau de race noire (Anatolie), âgé de 10 mois. Il ne s'en est suivi aucune réaction, mais le veau, éprouvé après 9 jours, a résisté à l'injection sous-cutanée de 5 c.c. de virus [1]. On peut donc conclure que les germes du typhus contagieux avaient passé au fœtus, mais en faible proportion. Notons que le liquide amniotique, inoculé à la dose de 5 c.c., n'a produit ni infection ni immunité chez un autre sujet.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Sensibilité des diverses races. — Nous avons dit ailleurs que l'inoculation, toujours mortelle pour les races perfectionnées et les races noires, ne l'est pas fatalement pour les animaux des steppes. Ceux-ci peuvent résister au virus de passage lui-même, lorsqu'on l'injecte par la voie sous-cutanée, intra-veineuse ou intratrachéale, mais ils semblent succomber fatalement quand on emploie la voie intracérébrale. Les expériences sur les moutons et les chèvres, relatées plus loin, montrent bien aussi que ce dernier mode d'infection doit être considéré comme plus sévère que les autres.

1. Bien qu'ayant toujours opéré sur des races qui succombent régulièrement à l'inoculation virulente, nous n'avons jamais omis de faire des témoins. Ceci dit pour toutes les expériences relatées dans ce mémoire.

Il existe en réalité une différence de sensibilité entre les races perfectionnées et les bovidés d'Anatolie (races noires). Cette différence apparaît nettement quand on fait des inoculations avec le sérum de passage, et quand on pratique la sérothérapie préventive ou curative. Lors de l'infection expérimentale, la durée de l'incubation est presque toujours plus courte de 24 heures chez les sujets sélectionnés, et la mort survient ordinairement un ou deux jours plus tôt. D'autre part, tandis que 5 c.c. de sérum suffiront pour vacciner un animal noir d'un an (par le procédé Kolle et Turner), il faudra au moins 10 c.c. pour obtenir le même résultat s'il s'agit, par exemple, d'un veau de Crimée. Enfin, la guérison par le sérum est infiniment plus aisée à réaliser dans le cas des animaux d'Anatolie que dans le cas des individus perfectionnés.

Nous avons inoculé, sans succès, un buffle d'un un an et demi. Le buffle doit donc être considéré comme peu sensible.

Produits virulents. — A titre de documents, nous indiquerons les faits suivants. L'humeur aqueuse est toujours active sous le volume de 1 c.c., inconstamment sous celui de 1/2 à 1/4 de c.c. Le liquide céphalo-rachidien se comporte de même. L'urine, inoculée deux fois à la dose de 5 c, c. a tué les animaux. Enfin, le liquide de lavage péritonéal (dont il sera parlé ultérieurement) peut tuer au 1/4 de c.c., mais se montre généralement moins riche en germes que l'humeur aqueuse ou la sérosité rachidienne,

Modes divers d'inoculation. — Au sujet de l'inoculation intraveineuse, nous rappellerons ici une expérience faite par M. Kolle. Deux animaux reçoivent chacun 1 cmc. de sang dans la veine de l'oreille. Chez l'un des sujets, le virus pénètre exclusivement dans le vaisseau : il n'en résulte ni infection ni immunité ; chez l'autre, un peu de sang se répand en dehors de la veine : la mort s'ensuit. M. Kolle se demande si l'injection intraveineuse n'aurait pas pour effet la destruction des germes, au moins dans certains cas.

Nous citerons, de notre côté, les deux observations suivantes qui semblent se contredire. On fait une série de passages, dans les veines, chez des sujets de races perfectionnées. Chaque inoculation se pratique avec 1/10 c. c. de sang (dose plusieurs fois mortelle sous la peau) ; la veine choisie est la jugulaire. Le 7e animal résiste et n'acquiert pas l'immunité. Par

contre on inocule un veau de Crimée, âgé de 1 an, avec 1 c. c. de sang virulent, dans une veine auriculaire. Séance tenante, on abat l'oreille au thermocautère : l'animal contracte la peste bovine.

Nous pensons que, lors de l'inoculation intra veineuse, le virus, dilué dans la masse sanguine, produit des effets différents selon sa richesse en germes. L'influence de la dilution d'une dose sûrement mortelle ressort en effet de ce qui va suivre.

Influence de la dilution du virus. — Voici trois expériences, très démonstratives. 1/60 de c. c. de sang, dilué dans 1, 5 c. c. d'eau physiologique, tue l'animal qui le reçoit (sous la peau). 1/60 de c. c. dilué dans 500 c. c. d'eau physiologique se montre inactif. Si une quantité quasi égale de germes, diluée dans des proportions variables de liquide, engendre des effets aussi différents, une quantité variable de germes, diluée dans la masse sanguine, devra amener aussi des résultats fort divers. C'est ainsi que nous expliquons l'expérience de M. Kolle et les nôtres.

Nous avions pensé à utiliser le principe de la dilution d'une dose sûrement mortelle pour vacciner les animaux; mais, en raison précisement de la proportion variable des germes, on ne réussit que dans certains cas.

Quoi qu'il en soit, l'influence de la dilution est importante à retenir.

RÉSISTANCE DU VIRUS

Résistance in vitro. — Nous signalerons tout d'abord quelques faits, utilisables pour ceux qui étudient la peste bovine. Une nouvelle expérience, dans laquelle du sang défibriné a été incorporé (*â â*) à de la gélatine, nous a montré qu'après 2 mois (à la glacière) le mélange ne tuait plus sous le volume de 5, 5 c. c. — Dans une autre recherche, nous avons constaté que le liquide céphalo-rachidien, maintenu 20 jours dans la glacière, était devenu inoffensif à la dose de 20 c. c. — Enfin, 70 c. c. d'une émulsion de rate, gardés 8 mois à la glacière dans l'eau salée (10 0/0) stérile, et n'ayant subi aucune altération, n'ont pas infecté l'animal qui les a reçus.

Le virus n'est pas très sensible aux acides, comme l'a mon-

tré jadis une expérience faite avec le bichlorhydrate de quinine. Il n'est pas non plus très sensible aux alcalis, ainsi qu'on va le voir. 1 gramme de ganglions mésentériques est broyé dans 8 c. c. de carbonate de sou de à 0,5 0/0. Après 3 jours, à la température ordinaire, on inocule 1/2 c. c. du liquide clair surmontant le dépôt : le sujet inoculé succombe.

Par contre, la dessication détruit aisément la virulence. Si l'on broie des ganglions mésentériques et qu'on dessèche la masse dans le vide, 0gr,01 inoculé après 2 jours sous forme d'émulsion se montre totalement inactif.

L'influence de la température et de l'aération a été étudiée par nous à maintes reprises. Voici à ce propos quelques données intéressantes :

2 à 8 c.c. de liquide céphalo-rachidien sont maintenus à 37° pendant 4 jours, en évitant l'évaporation. Au bout de ce temps, on inocule 1 c.c. à des veaux ; ceux-ci ne se trouvent ni infectés ni immunisés. Mêmes résultats avec le liquide de lavage péritonéal.

Plusieurs tubes, contenant 8 gouttes de sang, réparties dans 5 cmc. de sérosité rachidienne virulente, sont placés à 37°, les uns à l'air, les autres dans le vide. Après 7 jours, 1 c.c. du virus-air (bien agité) ne tue pas constamment, 1 c. c. du virus-vide ne tue jamais.

Plusieurs tubes, contenant 10 gouttes de sang réparties dans 5 c.c. de bouillon-Martin-sérum (sérum de cheval), sont mis à 37°, les uns à l'air, les autres dans le vide. Le virus-air, après 3 jours, tue régulièrement à la dose de 1 c. c ; après 5 jours il produit, à la même dose, une affection curable. Le virus-vide, après 3 jours, immunise les animaux (sans les rendre malades) à la dose de 1 c. c. ; après 5 jours, il est devenu inactif (à la même dose).

On voit donc que la conservation est plus longue pour le sang que pour le liquide de lavage péritonéal ou la sérosité rachidienne, ce qui tient évidemment à une différence dans le nombre des germes. Elle est plus longue à l'air que dans le vide, circonstance qu'on pourrait peut-être expliquer en admettant que l'agent pathogène est très aérobie [1].

1. Nous reviendrons plus tard sur certaines expériences, qui nous avaient tout d'abord fait croire à une culture de cet agent pathogène, mais que nous sommes plutôt portés aujourd'hui à expliquer par une conservation exceptionnellement longue du virus.

Désirant comparer, au point de vue de leur action bactéricide, le sérum de divers animaux, nous avons porté dans plusieurs tubes 3 c.c. de solution physiologique, 8 gouttes de sang virulent et 1 c.c. du sérum à étudier (sérum frais). Après 5 jours à 37°, 1 c.c. de chaque mélange (bien agité) a été inoculé à des animaux. L'expérience nous a montré que les sérums de cheval et de mouton conservaient la virulence, tandis que ceux de bœuf, de chèvre et de chien la détruisaient. Nouvelle preuve de l'absence totale de rapports entre le pouvoir bactéricide des humeurs et l'état réfractaire.

Résistance in vivo *chez la sangsue.* — 2 sangsues sucent le sang d'un veau infecté. Après 16 jours, on les broie dans 5 c.c. de bouillon ; on passe sur mousseline et on injecte le liquide sous la peau d'un animal gris de 2 ans. Celui-ci prend la peste bovine.

Les sangsues pourraient donc être employées dans certains cas pour la conservation du virus. Il est certain que celui-ci peut demeurer actif plus de 16 jours dans leur organisme. Il suffirait donc, au besoin, d'inoculer une dose supérieure à celle dont nous avons fait usage. En tout cas, nous sommes convaincus que le sang conserve bien mieux sa virulence chez la sangsue qu'*in vitro*, à masses et à températures égales.

Chez la grenouille. — 1 c. c. de sang a été inoculé dans le sac lymphatique dorsal d'une grenouille ; 15 jours après, le sang de la grenouille s'est montré inoffensif et n'a pas vacciné.

Chez le lapin. — Le virus peut se conserver un certain temps dans le cerveau[1] lorsqu'on l'y introduit. Nous avons fait à cet égard de nombreuses recherches, dont voici le résultat :

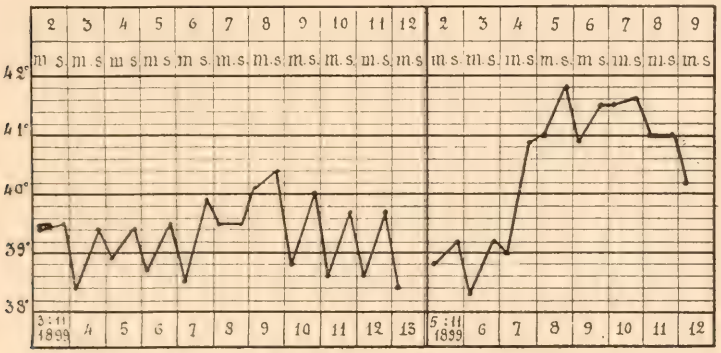
1/10e à 1/20e de c. c. de sang virulent tuent en un temps variable (5 à 38 jours). Les lapins succombent, intoxiqués par le poison normal du sérum des bovidés, auquel le poison pestique vient ajouter certainement son action (au moins dans le cas de mort rapide), ainsi qu'il ressort d'expériences comparatives fait avec le sang des bovidés sains. Nous avons inoculé, sans succès, aux veaux, 15 c. c. d'émulsion cérébrale épaisse d'un lapin mort en 23 jours ; 15 c. c. d'émulsion d'un autre lapin mort en 18 jours ; et 20 c. c. d'émulsion d'un troisième lapin, mort également en 18 jours.

1. Il n'a jamais été retrouvé dans le sang ni dans les viscères.

En injectant dans le cerveau du lapin 1/100e de c. c. de sang virulent, on tue l'animal en 8 1/2 à 25 jours.

Si l'on inocule 3/10e de c. c. de liquide céphalo-rachidien, le lapin succombe en 7 1/2 à 23 jours. Dans une expérience (la seule que nous ayons faite), 16 c. c. d'émulsion cérébrale d'un lapin mort en 7 jours 1/2 ont donné la peste bovine au veau.

Nous avons injecté, une fois, dans le cerveau du lapin, 1/10e de c. c. de sang, pris le 7e jour chez un mouton fébricitant (mouton inoculé lui-même, dans le cerveau, avec 1 c. c. de liquide céphalo rachidien). L'animal est mort en 19 jours. 1 c. c. d'émulsion cérébrale, inoculé à un veau, ne l'a pas rendu malade, mais l'a vacciné. (Courbes nº 2 et nº 3.)



Courbe 2.

Animal 78-11. Race d'Anatolie, un an. Inoculé, le 23.X. 1899, avec un c. c. d'émulsion épaisse du cerveau de 44.90 (lapin ayant reçu, dans le cerveau, 1/10 c. c. de sang du mouton 78.81 et ayant succombé en 19 jours). Pas de réaction. — Réinoculé le 10e jour avec 1 c. c. de virus. Fièvre légère, comme l'indique la courbe.

Courbe 3.

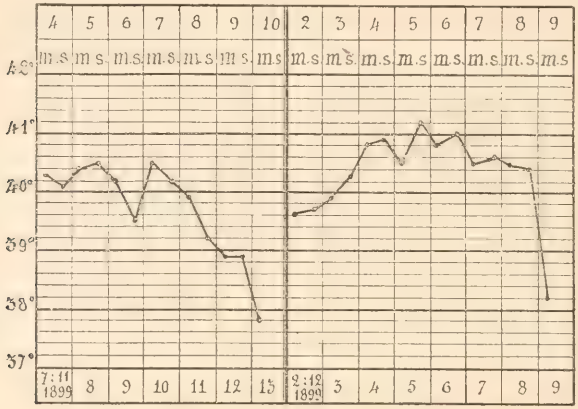
Animal 78-95. Témoin du précédent. Inoculé avec la même dose du même virus. Signes et lésions classiques. Mort le 9e jour. (La gazelle nº 1 constitue aussi un témoin de l'animal 78-11; elle n'a été inoculée, comme 78-95, que le 4. XI.)

Enfin, nous avons injecté 1/10e de c. c. du sang de la chèvre 78-53 (*vide infra*), recueilli à l'autopsie. Le lapin est mort en 21 1/2 jours. 9 c. c. d'émulsion cérébrale n'ont ni infecté ni immunisé un veau. La conservation du virus dans le cerveau du lapin semble donc soumise à des conditions très variables[1].

1. On notera toutefois que, *in vivo*, comme *in vitro*, les sérums du bœuf ou de la chèvre se montrent moins favorables à la conservation du virus que celui du mouton. On remarquera aussi que, *in vivo*, le liquide céphalo-rachidien est demeuré plus longtemps actif qu'*in vitro*.

Inoculations à la gazelle. — Le Dr Tahsin-bey a bien voulu nous envoyer de Tripoli d'Afrique 2 gazelles, dont nous ignorons l'espèce zoologique. Les courbes suivantes (courbes nº 4 et nº 5) démontreront la parfaite sensibilité de ces animaux, qui ont contracté la maladie type.

Inoculations intra cérébrales au mouton. — A 3 moutons de race asiatique, nous avons injecté, dans le cerveau, 1 c. c. de sérosité rachidienne virulente. Les animaux n'ont présenté qu'une réaction fébile. Leur sang, prélevé le 7e jour, a tué le veau



Courbe 4.

Gazelle nº 1. Reçoit, le 4. XI. 1899, 1 c. c. de virus sous la peau. Le 8e jour, diarrhée; le 10e jour, mort dans le coma. A l'autopsie, congestion violente de l'intestin, tuméfaction des ganglions mésentériques, rate normale, foie un peu cireux, bile presque incolore et fluide. La caillette n'offre pas de lésions. 5 c. c. de sang, pris le 7e jour, infectent l'animal 78:56.

Courbe 5.

Gazelle nº 2. Reçoit, le 1. XII. 1899, 1 c. c. de virus sous la peau. Le 6e jour, inappétence et boursouflement de la muqueuse gingivo-labiale. Le 8e jour, érosions et diarrhée. Le 9e jour, conjonctivite purulente, jetage, abattement extrême; mort dans la journée. A l'autopsie, congestion de la caillette et de l'intestin; pas d'autres lésions.

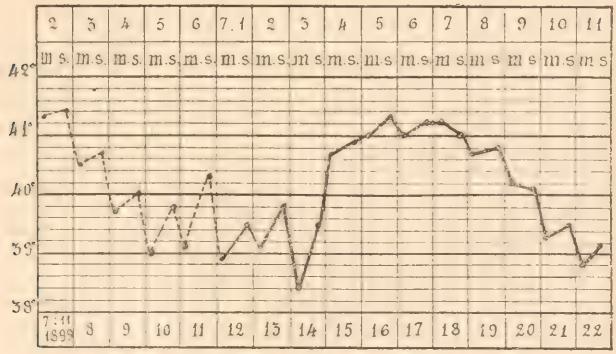
à la dose de 1 c. c. Un des moutons a été réinoculé après 38 jours (1 c. c. de liquide céphalo-rachidien dans le cerveau); il n'a pas réagi, mais 20 c. c. de son sang, prélevés le 7e jour, ont vacciné un veau.

1 c. c. de sang, recueilli le 7e jour sur un des 3 moutons mentionnés plus haut, n'a rien donné à un autre mouton

par la voie cérébrale. Le sang de ce second mouton, prélevé le 7e jour et inoculé au veau sous le volume de 1 c. c., s'est montré inactif.

1 c. c. de sang, recueilli le 7e jour sur un des 3 moutons, et inoculé dans le cerveau d'une chèvre de Malte, n'a produit qu'une légère réaction fébrile.

La peste bovine, comme nous l'avons indiqué antérieurement, se montre tellement grave chez les sujets tuberculeux que ceux-ci ne peuvent jamais être sauvés par le sérum. L'influence de la tuberculose ressortira également de l'expérience faite sur la chèvre 78-53 (*vide infra*). En présence de cette donnée, nous nous sommes demandé si, en combinant l'inoculation intracérébrale (la plus sévère de toutes) avec l'injection intraveineuse de *Streptothrix Nocardi*, on ne réussirait pas à



Courbe n° 6. *Mouton* 48-49.

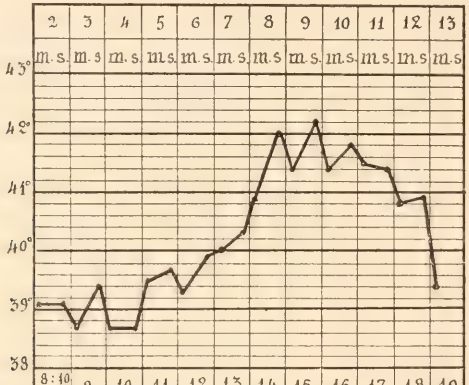
produire chez le mouton la peste bovine type. Deux expériences, identiques dans leurs résultats, sont venues démontrer que notre opinion était exacte. Nous relaterons en détail l'une de ces expériences.

Mouton 78-49. Animal de 23 kilogrammes, race asiatique. Le 6 novembre 1899 on émulsionne, dans 5 c. c. d'eau physiologique, 2 cultures sur gélose de *Streptothrix Nocardi* (géloses glycérinées, ayant séjourné 5 jours à 37°). On laisse déposer les grosses particules et on injecte, dans les veines, 4 c. c. du liquide surnageant. Il en résulte une réaction fébrile sans gravité. Le 12 novembre l'animal a perdu 3 kilogrammes. On lui inocule, dans le cerveau, 1 c. c. de liquide céphalo-rachidien virulent. Le 4e jour, la fièvre s'allume ; le 6e jour, apparaît

l'inappétence ; le 7e jour, on observe un boursouflement de la muqueuse gingivo-labiale ; le 8e jour, ce boursouflement aboutit à la formation d'érosions, en même temps que se manifeste de la diarrhée ; le 9e jour, les signes s'améliorent ; les jours suivants, tout rentre dans l'ordre. (Voir courbe no 6.)

Inoculations intra cérébrales à la chèvre. — On injecte 1 c. c. de sérosité rachidienne dans le cerveau d'une chèvre d'Anatolie. L'animal réagit par de la fièvre ; le 7e jour, 5 c. c. de son sang tuent un veau. Cette chèvre est réinoculée après 38 jours, (1 c. c. de liquide céphalo-rachidien dans le cerveau) ; elle présente un peu de fièvre et, le 8e jour, 20 c. c. de son sang vaccinent un veau.

On injecte à une chèvre de Malte, en lactation et tuberculeuse (chèvre 78-53), 1 c. c. de sérosité rachidienne dans le cer-



Courbe no 7. *Chèvre* 78-53.

veau. L'animal prend la peste bovine et en meurt. Voici son observation résumée.

Chèvre de 6-7 ans. Inoculée le 7 octobre 1899. Le 6e jour, début de la fièvre ; le 10e jour, inappétence et abattement ; le 12e jour, boursouflement gingivo-labial et diarrhée ; le 13e jour, érosions, coma, mort. (Courbe no 7.) A l'autopsie, on constate de la tuberculose du foie et du poumon droit ; le foie est atrophié et un peu cireux, la vésicule biliaire vide. Dans la caillette, on note des érosions et de la tuméfaction des follicules clos. Pas de lésions intestinales. Congestion des reins, 1 c. c. de liquide céphalo-rachidien, injecté à un veau, lui donne la peste bovine.

1 c. c. du sang de la chèvre 78-53, recueilli à l'autopsie et

inoculé dans le cerveau d'une chèvre d'Anatolie, n'a produit qu'une réaction fébrile; 1 c. c. inoculé dans le cerveau d'une chèvre de Malte (race plus sensible) a déterminé une fièvre assez marquée, accompagnée de diarrhée transitoire.

1 c. c. du même sang, injecté dans le cerveau d'un mouton sain, n'a engendré qu'une affection fébrile sans gravité. Enfin, 1 c. c. du sang de 78-53, recueilli le 7e jour et inoculé dans le cerveau d'un mouton atteint de lésions pulmonaires subaiguës, a tué l'animal en 7 jours et demi avec une courbe caractéristique. A l'autopsie, on s'est trouvé en présence d'une bronchopneumonie streptococcique, mais les cultures faites avec le cerveau sont demeurées stériles. Nous constatons donc, ici encore, l'influence des lésions antérieures sur la gravité de l'infection pestique.

VACCINATION PAR LA BILE

Nous nous contenterons de mentionner les faits suivants, nous proposant de revenir plus tard sur la théorie de la vaccination par la bile.

Inoculation de bile fraîche. — Elle nous a donné des résultats très variables, comme on pourra en juger par le résumé d'une de nos expériences. 4 animaux de race noire, âgés d'un an, reçoivent chacun 10 c. c. de bile (bile provenant d'un bœuf mort le 9e jour, 6e jour de la fièvre). Deux des veaux succombent, deux résistent. Ces derniers sont éprouvés le 10e jour; l'un meurt, l'autre reste bien portant.

Inoculation de bile conservée un jour dans la glacière. — Elle n'a jamais été suivie de réaction, mais n'a point toujours conféré l'immunité.

Les résultats observés avec la bile des animaux morts du virus de passage sont donc bien différents de ceux qu'on obtient avec la bile des animaux morts de la maladie naturelle. Ils diffèrent également de ceux que nous avons notés au début de nos recherches, alors que les passages n'avaient pas été encore très nombreux. Cela prouve que, tout en restant fixe d'une manière générale, le virus s'est cependant modifié, dans le sens d'une plus grande activité, ainsi que nous le disions au début de ce travail.

Inoculation de bile glycérinée. — La bile glycérinée (10 c. c. de

bile et 5. c. c. de glycérine, — d'après Edington) s'est montrée vaccinante, même après 40 et 85 jours de conservation à la température ambiante. Ces résultats concordent avec ceux de M. Rogers, qui a vu la bile glycérinée conserver son pouvoir jusqu'à 162 jours.

Inoculation de bile desséchée (dans le vide, sur $SO^4 H^2$). — Ramenée au volume initial (10 c. c.) par dissolution dans l'eau distillée, elle a également vacciné les animaux après 40 et 85 jours (la conservation doit être, sans nul doute, indéfinie).

Inoculation de bile additionnée de sang. — Nous avons mêlé 1 à 5 c. c. de sang à 10 c. c. de bile. Le temps de contact (dans la glacière) a été en moyenne de 16 heures. Les mélanges n'ont ni infecté ni immunisé les animaux. Nous savions déjà, par les expériences des autres auteurs, qu'il devait en être ainsi.

Inoculation de bile normale additionnée de virus. — Comme nos devanciers, nous avons constaté à maintes reprises que la bile normale détruit la virulence, sans acquérir de propriétés vaccinantes. Une seule fois il a été possible d'immuniser un animal, en lui injectant un mélange de 9 parties de bile et d'une partie de liquide de lavage péritonéal. Le mélange était resté pendant 23 heures à 22°. L'animal, éprouvé le 10e jour, a résisté, tandis que 3 témoins sont morts.

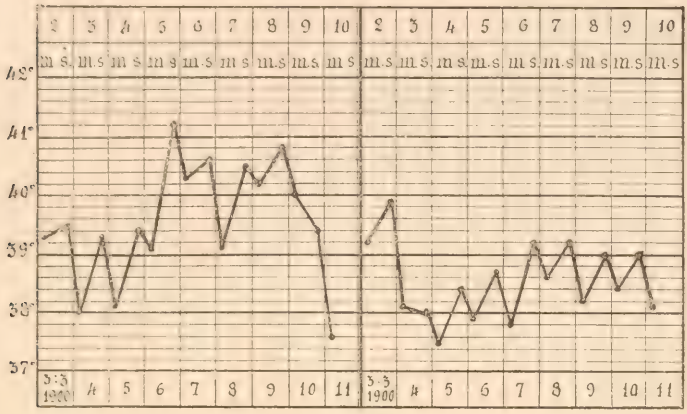
SÉROTHÉRAPIE

Préparation du sérum. — Nous ne reviendrons pas sur le procédé que nous avons indiqué dans notre premier mémoire et qui donne d'excellents résultats. Nous ferons simplement observer que, dans sa monographie intéressante sur la peste bovine, M. Kolle l'a indiqué et jugé d'une façon inexacte. Nous n'injectons en effet à chaque séance que du virus, et non du virus et du sérum; de plus, nous arrivons ainsi à obtenir un anti-corps très actif. Il serait vraiment extraordinaire que des inoculations massives et répétées se montrent inférieures à des inoculations répétées de quantités moindres de virus.

D'ailleurs, l'élévation du titre du sérum, régulièrement observée par nous, ne saurait laisser subsister le moindre doute. M. Kolle avance que notre sérum, employé au Soudan, a donné de médiocres résultats; les courbes suivantes (courbes n° 8, n° 9 et n° 10) prouvent qu'il n'était pas aussi mauvais que veut

bien le dire notre savant collègue, lequel ne l'a pas titré lui-même.

Nous persistons donc à affirmer que notre méthode, au moins aussi bonne que les autres, offre de plus l'avantage d'être très

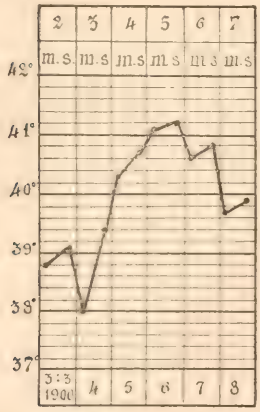


Courbe n° 8.

Animal 79-38. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit, le 2. III. 1900, 5 c. c. de sérum (mélange N) et 2 c. c. de virus. Fièvre seule.

Courbe n° 9.

Animal 79-80. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit, le 2. III. 1900, 10 c. c. de sérum (mélange N) et 2 c. c. de virus. Pas de réaction.



Courbe n° 10. *Animal* 79,44.

Animal 79-44. Témoin des précédents. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit le 2. III. 1900, 2 c. c. de virus. Signes et lésions classiques. Mort, dans la nuit du 7e au 8e jour, avec sang virulent (a infecté l'animal 79-39).

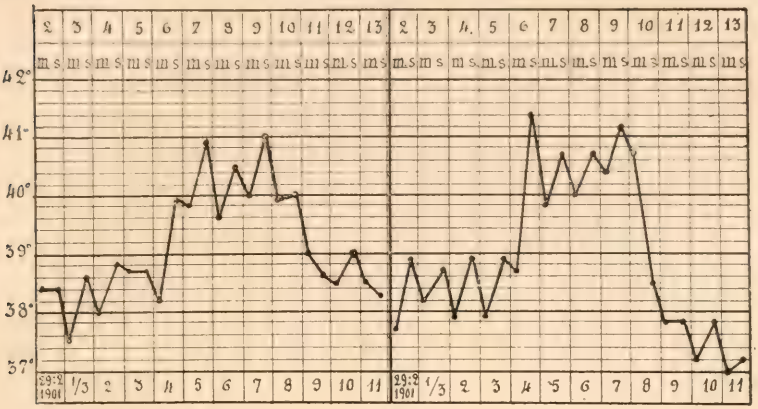
rapide. On prépare en peu de jours, grâce à elle, un sérum actif à la dose de 25 c. c. et rien n'est plus facile que d'augmenter ensuite son efficacité.

Mais, s'il est utile de commencer par des doses massives, il peut être avantageux de les diminuer ensuite, tout en rapprochant les inoculations (de manière que les animaux reçoivent toujours la même quantité de virus dans le même temps). Nous avons été amenés à procéder de la sorte pour faciliter la résorption du sang injecté, résorption qui finit par devenir de plus en plus lente, surtout chez certains animaux. En modifiant ainsi la technique, on remarque que les bœufs réagissent inconstamment et, lorsqu'ils réagissent, la fièvre est bien moins forte et moins durable qu'avec les fortes doses. Cependant, le sérum obtenu continue à augmenter d'activité [1].

Cherchant toujours à ménager le tissu cellulaire des animaux, en rendant la résorption du virus aussi rapide que possible, nous avons employé le plasma citraté (déjà indiqué dans notre premier mémoire); mais il nous a fallu l'abandonner, à cause de l'insuffisance de notre installation. C'est alors que nous avons eu recours au liquide de lavage péritonéal, exclusivement en usage depuis un an. Voici comment nous procédons pour l'obtenir. Lorsqu'un animal de passage commence à présenter de la diarrhée, on lui injecte, dans le péritoine, un mélange préparé en étendant de 3 volumes d'eau physiologique un volume de solution, légèrement alcaline, de peptone Martin, (obtenue par autodigestion de la caillette de veau). Le mélange, préalablement porté à 37°, est introduit dans la séreuse à la dose de 6 litres pour un veau d'un an (on augmente ou diminue la quantité, en proportion de la taille du sujet). Après 3 heures au moins, l'animal est sacrifié par hémorragie et l'on puise proprement le liquide intra abdominal. Celui-ci, d'aspect citrin, se coagule rapidement dans les vases où il a été reçu. On égoutte aseptiquement le caillot (volumineux, mais très léger), et on injecte le liquide clair qui en exsude. Toutes ces manipulations sont pratiquées fort habilement par le Dr Refik bey et le vétérinaire Refik-bey, assistés du vétérinaire Moustafa-bey, auxquels l'un de nous a confié la préparation du sérum antipestique. Si la sérothérapie a donné en Turquie d'aussi bons résultats dans la lutte contre le typhus contagieux, le mérite en revient donc, pour une grande part, à nos collaborateurs.

1. Nous avons aussi immunisé des animaux, avec de fortes doses, par la voie abdominale. C'est là un excellent procédé; d'ailleurs, selon nous, toutes les méthodes aboutissent finalement à des résultats identiques.

Le liquide de lavage péritonéal représente un virus parfaitement actif et d'une résorption excessivement rapide. Jamais il



Courbe n° 11.

Animal 74-145. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit, le 28. II. 1901, 5 c. c. du sérum de l'animal n° 18 et 5 c. c. de virus. Fièvre seule.

Courbe n° 12.

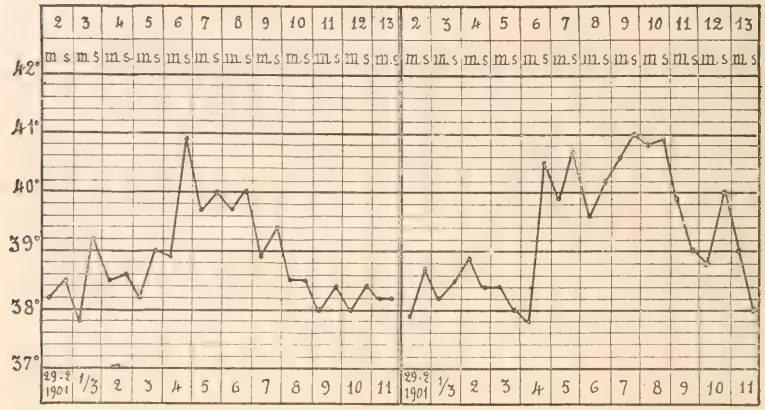
Animal 74-144. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit, le 28. II. 1901, 5 c. c. du sérum de l'animal n° 13 et 5 c. c. de virus. Fièvre seule.

n'a déterminé d'abcès chez les animaux inoculés. Il permet d'hyperimmuniser les bovidés avec le même succès que le sang citraté, et sans que les sujets réagissent jamais, particularité très intéressante au point de vue théorique. Il convient de noter toutefois que si les animaux ne présentent pas de réaction thermique, ils offrent par contre une réaction leucocytaire marquée, ainsi qu'il résulte des recherches du Dr Refik-bey (recherches qui seront publiées ultérieurement).

Nous injectons, dans une même séance, 2 à 3 litres de lavage et nous saignons les animaux le 10e, le 15e et le 20e jour. Le jour de la dernière saignée (et après celle-ci), on injecte à nouveau 2 à 3 litres de lavage et ainsi de suite. On arrive par ce moyen disions-nous, à obtenir un anticorps très efficace. C'est ce que démontrent les courbes suivantes, qui ont trait au sérum de sujets traités exclusivement par le liquide de lavage. Ces courbes (n° 11, n° 12, n° 13, n° 14 et n° 15) indiquent également que le sérum chauffé (une heure à 58°) et le sérum sec n'ont rien perdu de leur activité originelle.

Peut-on produire un sérum pratiquement utilisable en moins

de 10 jours? L'observation suivante ne laisse aucun doute à ce sujet. Un animal d'Anatolie, âgé de 5 ans, reçoit 4 litres de



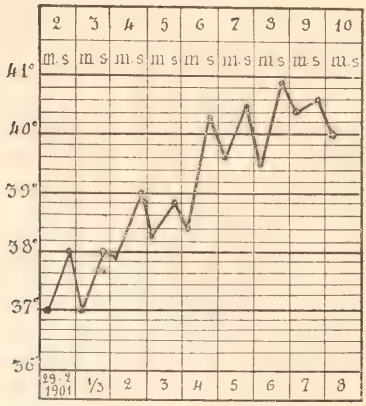
Courbe n° 13.

Animal 74-149. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit, le 28. II. 1901, 5 c. c. de sérum du l'animal n° 13. (Sérum chauffé une heure à 58°) et 5 c. c. de virus. Fièvre seule.

Courbe n° 14.

Animal 74-196. Race d'Anatolie, 1 an. Reçoit, le 18. II. 1901, 5 c. c. du sérum de l'animal n° 13. (Sérum sec 0,15, dissous dans 5 c.c. d'eau physiologique) et 5 c.c. de virus. Fièvre seule.

sang virulent et 250 c. c. d'un sérum peu actif (au début de nos recherches). Il n'offre qu'une réaction fébrile modérée. Le 4e jour, son sérum ne vaccine pas (méthode Kolle et Turner) à



Courbe n° 15.

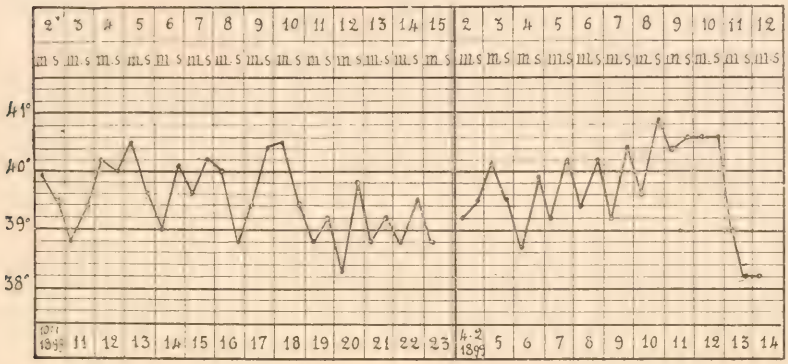
Animal 74-165. Race d'Anatolie, 1 an. Témoin des quatre précédents. Reçoit, le 28. II. 1901, 5 c. c. de virus. Signes de lésions classiques. Mort le 10e jour.

la dose de 25 c. c.; le 6e jour, il vaccine, à cette dose, un sujet

de race très sensible (Crimée). Il s'en faut cependant que l'expérience réussisse constamment.

Les bovidés sont-ils seuls susceptibles de fournir du sérum antipestique?

Le cheval (une expérience) nous a donné des résultats assez difficiles à interpréter pour le moment, mais que nous considérons, jusqu'à nouvel ordre, comme négatifs. Le mouton, auquel on inocule 1 litre de sang virulent, offre, le 15e jour, un sérum parfaitement actif. (Courbes n° 16 et n° 17.) Par contre, la chèvre,



Courbe 16.

Mouton A. Race asiatique, 22 kilos. Reçoit, sous la peau, le 9. I. 1899, un litre de sang citraté du bœuf 75,76. Fièvre seule.

(Une chèvre d'Anatolie, de 39 kilos, reçoit, le même jour, un litre du même virus. Elle présente de la fièvre, mais son sérum n'acquiert aucun pouvoir immunisant.)

Courbe 17.

Animal 75-53. Race d'Anatolie, 2 ans. Inoculé, le 3. II. 1899, avec 1 c. c. de virus et 25 c. c. de sérum du mouton A, prélevé le 15e jour. Fièvre seule. (Avec la même dose du même virus, on a inoculé 7 autres animaux, qui sont tous morts.)

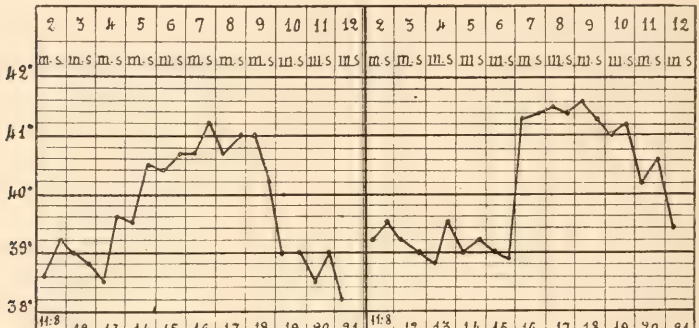
à laquelle on injecte jusqu'à 2 litres de sang virulent, ne produit aucun anticorps, même après plus de 15 jours. Enfin, le sérum d'une oie de 5 1/2 kilogrammes, qui avait reçu 250 c. c. de sang virulent dans le péritoine, s'est montré inefficace le 16e jour, à la dose de 30 c. c.

Propriétés du sérum. — Nous ne reviendrons pas sur son pouvoir préventif et curatif, bien connu aujourd'hui. Rappelons que, pour le titrage, nous employons toujours la méthode Kolle et Turner, et que nous prenons comme test-objet, ainsi qu'on a pu le voir, un veau de la race d'Anatolie, âgé de 1 an. Inutile de dire que l'épreuve est toujours faite avec le virus de passage.

Quelle que soit la méthode d'hyperimmunisation usitée, il est impossible d'obtenir des *mélanges* actifs à plus de 5 c. c. Nous avons bien rencontré parfois des animaux qui fournissaient un sérum actif à 2,5 c. c., mais, *en moyenne*, il ne faut point compter dépasser la limite que nous avons indiquée. Cette limite, par contre, n'est pas difficile à atteindre.

En pratique, nous nous en tenons à l'application du sérum seul, comme moyen préventif. L'immunité, ainsi créée, a toujours permis aux animaux de traverser victorieusement la période épidémique. Cela n'implique de notre part, répétons-le, aucune défiance vis-à-vis de la méthode Kolle et Turner, que nous continuons à considérer comme excellente.

Au point de vue curatif, nous avions abandonné l'injection intraveineuse, qui détermine parfois de l'hémoglobinurie, d'ailleurs sans gravité, hémoglobinurie due incontestablement à



Courbe 18.

Animal 77-42. Race mixte (Crimée-Anatolie), 1 an. Reçoit, le 10. VIII. 1899, 10 c. c. de sérum (mélange E) et 2 c. c. de virus. Fièvre seule.

Courbe 19.

Animal 77-8. Reçoit, le 10. VIII. 1899, 10 c. c. de sérum (mélange E) étendus de 90 c. c. de sérum normal de bœuf. Signes et lésions classiques. Mort le 12e jour.

l'effet d'une isolysine. Maintenant que nos animaux sont immunisés avec le lavage péritonéal, il n'y aurait plus, croyons-nous, d'inconvénient à reprendre la voie vasculaire.

On sait que, d'après M. Wassermann, le peu d'efficacité de certains sérums spécifiques serait dû à leur teneur relativement trop faible en alexine. Pendant l'immunisation, l'anticorps augmente en effet de plus en plus, tandis que la substance bacté-

ricide demeure stationnaire. Il s'ensuivrait que la majeure partie de la matière préventive, ne pouvant se combiner à l'alexine, resterait inactive. D'où l'idée d'ajouter du sérum neuf au sérum spécifique. Sans croire beaucoup à la réussite d'une pareille expérience, nous avions cependant pensé à la faire, et cela avant même que parût le travail du savant allemand. Les résultats ont été exactement opposés à ceux qu'indique la théorie, ainsi que le démontrent les faits suivants, où l'addition de sérum neuf a complètement paralysé l'action de l'anticorps spécifique.

Sérum employé curativement. — Le 1er juin 1900, on infecte 2 animaux de race très sensible. Le 6e jour (2e jour de la fièvre), on injecte à l'un d'eux (80-92) 100 c. c. de sérum antipestique et à l'autre (80-71) 100 c. c. de sérum antipestique mélangés à 320 c. c. de sérum normal de bœuf (sérum frais). L'animal 80-92 guérit facilement; au contraire, l'animal 80-71 succombe le 9e jour, sans que la maladie ait été le moins du monde influencée par le sérum.

Sérum employé préventivement. — On inocule, à 2 animaux de race très sensible, 2 c. c de virus. En même temps, l'un (77-42) reçoit 10 c. c. de sérum antipestique et l'autre (77-8) 10 c. c. de sérum antipestique dilués dans 90 c. c. de sérum normal de bœuf (sérum frais). Le premier n'offre que de la fièvre, l'autre prend une affection mortelle (courbes n° 18 et n° 19).

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
ET A LA CLASSIFICATION DES SEPTICÉMIES HÉMORRAGIQUES
LES « PASTEURELLOSES »

PAR M. J. LIGNIÈRES

Chef des travaux à l'École vétérinaire d'Alfort.

Tout microbe fixant surtout aux deux extrémités les couleurs ordinaires d'aniline, se décolorant par les méthodes de Gram et de Weigert, poussant sur gélatine sans produire de liquéfaction, et capable de provoquer dans l'organisme des lésions aiguës septicémiques, recevait jusqu'ici le nom de bactérie ovoïde, et l'affection dont il était l'agent spécifique rentrait dans le groupe des septicémies hémorragiques.

Ces quatre caractères suffisaient aux exigences de la classification qui, encore aujourd'hui, est admise par presque tous les auteurs.

En se contentant d'un nombre aussi restreint de caractères, on élargissait démesurément le cadre de ce groupe, au point de le voir envahir des territoires qui ne devaient jamais lui appartenir. Ainsi la conception si juste de Hueppe (1886) était faussée, et l'on voyait figurer côte à côte une foule de microbes sans parenté aucune.

Mes études sur la fièvre typhoïde du cheval[1], l'entiqué, la diarrhée des veaux et le lombriz[2] m'ont permis de déterminer exactement les caractères morphologiques et biologiques de leurs microbes spécifiques et de reconnaître leur parenté étroite.

A côté de ces affections, je plaçai bientôt le choléra des poules, la maladie des chiens et une maladie des porcs (*Schweineseuche*) confondue généralement en France avec le hog-choléra[3]. Enfin, je proposai de réunir dans un même groupe, sous le nom

1. Étiologie de la fièvre typhoïde du cheval, *Société centrale de Médecine vétérinaire*, 10 juin et 22 juillet 1897.

2. Contribution à l'étude de la lombriz et de la diarrhée des jeunes bovidés et de l'entiqué, *Société centrale de Méd. vétér.*, 30 décembre 1898.

3. Contribution à l'étude et à la classification des septicémies hémorragiques. Association des Hacendados, Buenos-Ayres 1900. *Société centrale de médecine vétérinaire*. Séance des 28 mai, 14 et 21 juin, 12 et 16 juillet 1900.

de pasteurelloses, toutes ces affections déterminées par des microbes ayant une grande parenté : les pasteurella[1].

Voici, tels que je les ai établis, les caractères spécifiques invariables des pasteurella :

Cocco-bacilles sans mouvement de translation, ne prenant pas le Gram, très polymorphes, donnant des formes d'involution, ne liquéfiant pas la gélatine, ne coagulant pas le lait dont la réaction reste normale, ne donnant pas de culture visible sur pomme de terre naturelle[2] ni d'indol dans le bouillon pancréatique[3], ne rougissant pas la gélose de Wurtz, surtout aérobies, mais aussi anaérobies, présentant une odeur *sui generis* dans les cultures. Pas de spores, pas de cils, virulence très variable, en général grande. Par injection intraveineuse, affinité spéciale pour les synoviales tendineuses et articulaires.

Les caractères que je viens de mentionner sont fixes, l'absence de l'un ou de l'autre exclut le microbe du groupe des pasteurella tel que je l'entends aujourd'hui. Comme indication générale, on peut mentionner que ces microbes se colorent facilement aux deux extrémités en laissant le centre clair, qu'ils ne se colorent pas aussi aisément que d'autres microbes, le coli par exemple ; qu'ils poussent parfois discrètement sur les milieux de culture habituels, que dans certains cas, enfin, ils sont très difficiles à mettre en évidence au sein de l'organisme.

Actuellement, le groupe des pasteurelloses comprend :

1° La pasteurellose aviaire dont le type est le choléra des poules, capable d'infecter naturellement tous les oiseaux et le lapin (septicémie des lapins de Smith, Thoinot et Masselin) ;

2° La pasteurellose porcine connue sous le nom de *Schweineseuche*, *swine-plague*, pneumo-entérite, *schweineseptikämie* :

3° La pasteurellose ovine ou septicémie hémorragique du

1. J'ai, de plus, jeté les bases d'un autre groupe, celui des salmonelloses, ayant pour type le microbe du hog-choléra de Salmon.

2. Afin d'éviter tout malendu concernant la culture sur pomme de terre, il est bien établi que j'envisage la pomme de terre naturelle dont la réaction normale est légèrement acide ; dans ces conditions, on ne voit pas se former de culture à 37°-38°. Si cependant on racle la surface avec la palette de platine, on ramène une pulpe où les microbes peuvent être assez nombreux. Ils représentent ceux qui ont été ensemencés ou bien une insignifiante pullulation toujours invisible à l'œil nu produite à la faveur du bouillon, de particules de gélose ou de produits organiques portés sur la pomme de terre au moment de l'ensemencement.

3. Pour reconnaître l'indol, j'ai toujours employé le procédé de Péré : culture dans le bouillon peptone pancréatique, puis, après 3 ou 4 jours, addition de 1 c. c. de solution fraîchement préparée d'azolite de potasse à 2/10,000 plus quelques gouttes d'acide sulfurique pur.

mouton, pneumo-entérite, *lombriz*, pneumonie infectieuse des chèvres;

4° La pasteurellose bovine, dans laquelle nous trouvons la même affection décrite sous des noms différents : *Wild-* et *Rinderseuche*, septicémie hémorragique des bovidés, pneumo entérite du bœuf, *barbone* des buffles, pleuro-pneumonie septique des veaux, entiqué;

5° La pasteurellose équine, qui comprend la fièvre typhoïde du cheval ou influenza sous toutes ses formes et complications; pleuro-pneumonie contagieuse, pneumonie infectueuse, pneumo-entérite, etc.;

6° La pasteurellose canine ou maladie des jeunes chiens dans toutes ses manifestations[1].

Le rôle des pasteurella est extrêmement différent suivant les cas. Ou bien elles envahissent l'organisme entier en déterminant des accidents graves, à marche souvent très rapide; ou encore leur action peut être fugace, éphémère, cachée, légère et de longue durée; elles jouent alors un rôle secondaire, préparatoire, passif. Dans le premier cas, on retrouve assez facilement les pasteurella au sein des tissus; dans le second, on éprouve parfois des difficultés insurmontables pour les déceler.

Grâce à ces recherches, j'ai pu non seulement rassembler un certain nombre d'affections ayant une parenté étroite, mais il m'a été aussi possible d'en séparer complètement d'autres, comme le hog-choléra-B. suipestifer, — la septicémie des furets, certaines septicémies des lapins, beaucoup d'affections des oiseaux, etc..., qui jusqu'alors étaient rangés à côté des pasteurelloses. Enfin, j'ai pu rétablir les caractères exacts de plusieurs microbes, dits spécifiques, mais mal déterminés.

Par ce court résumé, j'ai eu seulement l'intention d'indiquer les conclusions les plus importantes de mes recherches sur les septicémies hémorragiques. Quant aux détails, on les trouvera dans les mémoires que j'ai publiés à Buenos-Aires et à la Société centrale de médecine vétérinaire.

1. Dans le travail qui a trait à la maladie des chiens, je démontre expérimentalement le mécanisme de la pneumonie dite *a frigore*.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Le Gérant : G. Masson.

15me ANNÉE OCTOBRE 1901 No 10

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LES PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA TRYPSINE ET LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SÉRUM DES COBAYES NEUFS ET IMMUNISÉS

PAR PIERRE ACHALME.

L'étude des propriétés antidiastasiques des sérums est de date toute récente. Latente dans les travaux de Fermi, Hahn, Hildebrandt, elle ne s'est bien précisée que depuis les recherches de Morgenroth, sur la présure et les propriétés antiprésurantes du sérum. Mais, d'une part, l'absence d'action pathogène de la présure, d'autre part, l'obscurité qui règne sur la nature intime des phénomènes de coagulation qu'elle provoque, ne permettaient aucune comparaison entre le pouvoir antidiastasique et le pouvoir antitoxique.

Il m'a semblé que l'étude de l'action du sérum sur des diastases à action chimique bien définie pourrait être d'un certain secours dans l'explication de ces phénomènes si complexes, et que, si l'on pouvait trouver une diastase provoquant en même temps des effets pathogènes bien caractérisés, il serait possible d'établir une relation entre l'étude trop exclusivement chimique des diastases et celle trop exclusivement physiologique des toxines.

L'influence nuisible de la réaction alcaline du sérum sur l'action de l'émulsine et de la sucrase m'ont fait abandonner ces deux diastases après quelques recherches. L'uréase ne m'a pas non plus donné les résultats que j'en espérais.

J'ai trouvé au contraire dans la pancréatine un excellent

instrument d'études, son action chimique étant facilement mesurable et la lésion qu'elle provoque en injections sous-cutanées étant très caractéristique et très constante.

Je m'étonne que cette dernière n'ait pas été plus attentivement décrite par les observateurs. Dans la littérature, on ne trouve qu'une courte mention de ce processus nécrotique dans le livre de M. Gautier sur les toxines microbiennes et animales. D'autres auteurs, par exemple Schepilewsky, insistent au contraire sur les suppurations consécutives aux injections de pancréatine. L'usage de liqueurs diastasiques insuffisamment privées de bactéries explique ces contradictions. Il est donc nécessaire de se mettre à l'abri de cette cause d'erreurs.

Préparation de la solution de pancréatine.

La pancréatine du commerce n'est autre chose que du pancréas de porc, traité par l'alcool et l'éther, puis réduit en poudre et tamisé. C'est de cette pancréatine que je me suis servi, et afin d'avoir des résultats certainement comparables, toutes mes expériences ont été faites avec de la pancréatine provenant d'un même achat.

Cette pancréatine se dissout mal dans l'eau et ne lui communique que lentement, par macération, des propriétés diastasiques. Un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, en présence d'un peu de chloroforme pour empêcher la fermentation, est le meilleur moyen d'obtenir une solution présentant une grande activité.

La proportion de 5 0/0 de pancréatine sèche m'a paru la plus commode pour l'expérimentation. Au-dessous de cette dose, l'activité de la solution est insuffisante, et on est obligé d'injecter de trop grandes quantités de liquide pour provoquer les lésions décrites plus loin.

Après 24 heures de séjour à l'étuve, la macération est filtrée sur papier, puis exactement neutralisée, s'il y a lieu, de manière à être insensible à la phtaléine du phénol et au méthyl-orange. Mais, ainsi préparée, elle n'est pas suffisamment débarrassée de bactéries, et, injectée telle quelle, elle donne lieu à des septicémies et à des abcès qui ont forcément obscurci l'histoire des accidents consécutifs aux injections de cette diastase. Il est en

effet remarquable que la pancréatine est un très puissant favorisant de l'infection microbienne, et qu'un microbe de race peu pathogène (*Bacterium coli*, *Proteus*) donne lieu à des accidents mortels s'il est injecté en même temps qu'une solution tryptique.

Le seul moyen de se mettre avec certitude à l'abri de ces accidents d'infection est la filtration sur bougie de porcelaine. Contrairement à l'opinion généralement répandue, la pancréatine filtre très bien, surtout si l'on opère sur une solution tiède de 35° à 38°. et avec une bougie bien poreuse, neuve ou soigneusement régénérée. La déperdition diastasique résultant de la filtration est d'environ 25 à 35 0/0.

La pancréatine filtrée sur porcelaine présente toutes les propriétés diastasiques de la pancréatine ordinaire. Elle dissout l'albumine de l'œuf, la fibrine, digère le lait, liquéfie la gélatine, saccharifie l'amidon, acidifie les solutions de monobutyrine. Je signale néanmoins que je n'ai jamais, dans les digestions artificielles que j'ai faites, observé la formation de cristaux de tyrosine. Mais, ainsi que le fait observer M. Duclaux ces précipités sont très capricieux, même avec la pancréatine ordinaire, et il n'y a rien à conclure de leur absence.

Mesure de l'action tryptique de la pancréatine et du pouvoir antitryptique du sérum.

Pour mesurer l'action tryptique d'une pancréatine, et mieux encore l'action antitryptique d'un sérum, j'ai préféré à la fibrine colorométrique de Gehrig ou aux tubes de Mette une méthode plus simple, basée sur les changements d'aspect présentés par le lait sous l'influence de la digestion pancréatique.

Mes recherches sur les diastases du pus m'ont en effet, conformément à l'opinion de M. Duclaux, porté à admettre l'identité entre la caséase et la trypsine, alors que quelques doutes subsistent en ce qui concerne la diastase qui liquéfie la gélatine.

La précipitation de la caséine, puis la redissolution du précipité, aboutissant à la clarification complète de la liqueur, offrent à l'observateur des éléments qui permettent de bien suivre la marche du phénomène et d'arriver à des évaluations comparatives très précises.

Pour cela, le lait, soigneusement écrémé, est réparti dans de

petits tubes de diamètre égal : chacun en reçoit 3 c. c. Les tubes sont ensuite stérilisés une demi-heure à 120°.

Le sérum et la solution diastasique étant amicrobiens, les digestions peuvent se prolonger autant qu'il est désirable sans qu'il soit nécessaire d'introduire une substance étrangère pour protéger le milieu contre l'envahissement des microbes. Pourtant, afin d'éviter le développement des bactéries qui auraient pu contaminer le liquide pendant les manipulations, il est préférable d'opérer à une température élevée, 45° ou 46° par exemple, qui, tout en restant très favorable à l'action de la trypsine, l'est fort peu au développement microbien.

Pour mesurer l'action antitryptique d'un sérum, il suffit d'ajouter une goutte de sérum à un certain nombre de tubes de lait, et d'y introduire ensuite un nombre progressif de gouttes de solution tryptique. On observe alors les modifications qui se produisent, et, après un temps déterminé, 24 heures par exemple, on note le numéro du premier tube resté intact, qui donne ainsi le nombre de gouttes de solution diastasique neutralisées par une goutte de sérum. Si l'on opère à la fois sur plusieurs sérums, par exemple un sérum de cobaye neuf et un sérum de cobaye vacciné, on peut aussi évaluer d'une manière exacte l'augmentation du pouvoir antitryptique résultant de l'immunisation.

Si l'on veut donner à ces évaluations une valeur plus absolue, il est possible de préparer une solution tryptique présentant une activité à peu près constante. On peut en effet prendre comme solution normale une liqueur dont 5 gouttes, à 45°, digèrent les 3 c. c. de lait d'un tube en une heure. Ce choix n'est pas arbitraire. Le mode de préparation indiqué plus haut donne en effet une solution possédant en général un pouvoir légèrement supérieur : par l'addition d'un peu d'eau physiologique stérilisée, on peut facilement la ramener à la force de cette solution normale. En prenant un lait de même densité, et en le préparant toujours de la même manière, on peut aussi assurer aux conditions expérimentales une constance suffisante pour que les résultats soient comparables.

Lésion provoquée par la pancréatine chez le cobaye.

Lorsqu'on inocule dans le tissu cellulaire sous-cutané du cobaye 3 ou 4 c. c. de la solution de pancréatine à 5 0/0 filtrée

sur bougie de porcelaine, on observe les phénomènes suivants :

D'abord un gonflement rapide se produit autour du point d'inoculation, et est déjà très accentué au bout de dix minutes. Puis la peau devient humide par suite d'une abondante exsudation de sérosité. Au bout de 3 ou 4 heures, elle présente un aspect macéré, et les poils s'en détachent avec facilité sur une surface parfois fort étendue, la moitié de la région abdominale par exemple, si l'inoculation a été faite à la racine d'un des membres postérieurs. Le derme mis à nu présente une couleur cyanotique et toute la région est le siège d'un gonflement œdémateux. Peu à peu l'apparence ecchymotique fait place à une coloration plus foncée, le suintement séreux s'arrête, et la partie malade se dessèche superficiellement pour présenter au bout de 15 à 20 heures l'aspect d'une escarre parfaitement caractérisée. Si la dose a été trop forte ou l'animal insuffisamment résistant, la mort peut survenir au bout de 36 heures ; sinon, après 2 ou 3 jours, un sillon d'élimination apparaît, l'escarre se détache et sa chute est bientôt suivie d'un processus de cicatrisation qui évolue souvent avec une rapidité surprenante.

Si l'on sacrifie l'animal pendant les premières heures du processus, on constate que dans toute la région tuméfiée, le tissu sous-cutané est le siège d'un œdème gélatiniforme rosé, absolument analogue à celui que l'on trouve à l'autopsie des animaux inoculés avec le vibrion septique. Cet œdème peut envahir le tissu sous-cutané, même à une grande distance du point d'inoculation. Les muscles sous-jacents présentent un œdème interstitiel avec une congestion interne, allant en certains points jusqu'à la formation de petites ecchymoses. L'examen microscopique du liquide infiltré montre la présence d'un grand nombre de globules rouges et l'absence de microorganismes, absence facilement contrôlée par les cultures.

Si la mort est survenue spontanément, on ne constate aucune lésion viscérale, si ce n'est de la congestion pulmonaire et rénale. Le sang du cœur n'est pas coagulé ; enfin, si un peu de temps s'est écoulé entre le moment de la mort et celui de l'autopsie, on observe fréquemment une disparition presque complète de la paroi stomacale par auto-digestion. Ce phénomène remarquable est encore plus accusé et plus constant lorsque l'animal a été intoxiqué par la papaïne.

J'ai étudié histologiquement la lésion nécrotique aux différentes phases de sa production. Elle consiste d'abord en une véritable paralysie vasomotrice des capillaires sanguins, qui augmentent de volume et laissent passer en abondance le sérum et les globules rouges, sans que l'on puisse observer de changements bien nets dans la colorabilité des cellules du tissu conjonctif et des parois vasculaires. Les cellules épidermiques, macérées par l'exsudation séreuse, se détachent ensuite et tombent, laissant les papilles presque à nu. A cette seconde période, le tissu sous-cutané est uniformément infiltré de globules rouges peu altérés : autour des capillaires de la couche papillaire et de la couche profonde du derme apparaît une abondante diapédèse de leucocytes polynucléaires. Les cellules du tissu conjonctif des parties infiltrées conservent encore à cette période leur aspect habituel et leur colorabilité normale, qui ne se modifient que tardivement, alors que macroscopiquement l'escarre est nettement caractérisée.

D'après cet examen, il semble donc que les phénomènes vaso-moteurs jouent le principal rôle dans la production de la lésion, et que la nécrose résulte plutôt d'un véritable étranglement circulatoire que d'une mortification directe des tissus sous l'influence de la pancréatine.

La complexité de cette dernière, et la presque impossibilité de séparer les unes des autres les diverses diastases que l'on y rencontre, rendent difficiles toutes les recherches ayant pour but d'isoler la substance à l'activité de laquelle est dû le processus ci-dessus décrit. Néanmoins, en procédant par analogie, on peut se convaincre facilement que la trypsine est l'élément nocif. Alors que d'autres amylases ou d'autres lipases ne montrent en effet aucun pouvoir pathogène, on peut au contraire reproduire des accidents absolument identiques à l'aide d'une solution de papaïne filtrée sur bougie de porcelaine. Or les solutions de pancréatine et de papaïne n'ont pas d'autre caractère commun que l'analogie de leur action tryptique sur les substances albuminoïdes.

Si l'on considère d'autre part que la lésion produite présente également de grandes ressemblances avec celles que causent les microbes fortement trypsinogènes, comme le vibrion septique, le bacille du charbon symptomatique, le bacille du rhumatisme,

il sera logique d'attribuer à la trypsine le rôle prépondérant dans la pathogénie de la lésion pancréatinique.

Vaccination du cobaye.

Dès le début de mes recherches, j'ai constaté que les injections intrapéritonéales de pancréatine étaient beaucoup mieux supportées que les injections hypodermiques. On peut en effet introduire dans le péritoine jusqu'à 10 c. c. de solution de pancréatine à 5 0/0 sans provoquer autre chose que des accidents passagers. Ces accidents consistent en une sorte de stupeur de l'animal, avec rigidité presque tétanique des parois abdominales ; cette stupeur est quelquefois suivie d'un peu de diarrhée sanguinolente.

Si l'on sacrifie l'animal après une injection intrapéritonéale, on constate une rougeur uniforme de la séreuse et de l'intestin, et la présence dans la cavité d'une assez grande quantité de sérosité rosée contenant des globules rouges en suspension. La pathogénie de la lésion est la même que dans le tissu cellulaire sous-cutané ; mais, par suite de l'épanchement de la sérosité dans la cavité péritonéale ou intestinale, la paralysie vaso-motrice n'aboutit pas ici à l'étranglement et à la nécrose.

L'utilisation de ce phénomène permet d'obtenir l'immunisation des cobayes d'une manière beaucoup plus sûre et plus rapide que par l'inoculation sous-cutanée. En injectant dans le péritoine d'un cobaye adulte 5 c. c. de solution de pancréatine, puis le lendemain et le surlendemain 10 c. c., on peut dès le 4e jour introduire sous la peau du flanc 2 c. c. et continuer les injections tous les 2 jours en augmentant chaque fois de 2 c. c., de manière à atteindre, le 12e jour, la dose de 10 c. c., c'est-à-dire plus de deux fois la dose mortelle pour un cobaye de force moyenne.

Pour ne pas s'exposer à des mécomptes dans la pratique des injections intrapéritonéales, il est nécessaire de faire la piqûre dans la région péri-ombilicale. Au-dessus, l'estomac distendu est souvent appliqué si intimement contre la paroi que l'aiguille pénètre facilement dans son intérieur, et que l'injection a lieu dans la cavité stomacale et non dans la cavité péritonéale. Si l'on fait au contraire l'injection trop bas, on risque de léser les vésicules séminales ou les cornes utérines et de provoquer des accidents mortels. Dans la région ombilicale au contraire, si

l'aiguille est introduite doucement après la perforation de la peau, l'intestin fuit devant elle et l'injection ne cause aucun accident.

Les injections sous-cutanées doivent être faites de préférence dans les régions où la peau est doublée d'un tissu cellulaire lâche, la peau du flanc par exemple. La réaction vaso-motrice est plus rapide encore chez les animaux vaccinés que chez les cobayes neufs. Le gonflement est moins étendu, mais assez intense pour donner lieu par la piqûre de l'aiguille à un écoulement de sérosité rosée qui débute aussitôt après l'injection. La rougeur et la tuméfaction se dissipent en quelques heures sans laisser aucune induration au point d'inoculation.

Des coupes de la lésion cutanée des animaux vaccinés montrent un processus identique à celui décrit chez les animaux neufs : la diapédèse des leucocytes polynucléaires semble néanmoins plus précoce et plus abondante.

La vaccination éprouve beaucoup les animaux qui y sont soumis. Ils maigrissent au point de perdre jusqu'au quart de leur poids. Ils deviennent tristes, mangent peu. Leurs poils deviennent secs, ternes, et s'arrachent facilement.

Si l'inoculation sous-cutanée a été trop forte, l'escarre qui se produit se détache plus difficilement que chez le cobaye neuf. L'ulcération qui en résulte se cicatrise beaucoup plus lentement et devient plus fréquemment le point de départ d'une infection générale mortelle.

A l'autopsie des animaux sacrifiés ou morts spontanément, on trouve le foie, les reins et les capsules surrénales congestionnés. La rate est toujours volumineuse, tout en présentant un aspect lavé assez caractéristique.

Action antitryptique du sérum de cobaye neuf.

L'action antitryptique du sérum sanguin a été déjà sommairement signalée par plusieurs auteurs, tels que Camus et Gley, Hahn, Landsteiner, Georges Dean, Surmont, Carnot et enfin par Mesnil qui donnait, dans le numéro de mai 1901 des *Annales de l'Institut Pasteur*, une étude comparée des sérums normaux sur la diastase protéolytique qu'il a retirée des actinies.

Me servant, pour mesurer le pouvoir antitryptique, du lait que ce dernier auteur n'avait employé que pour mesurer le pouvoir antiprésurant, je me suis assuré que le sérum de cobaye neuf ou vacciné, recueilli aseptiquement et *séparé le plus rapidement possible du caillot*, ne provoque par lui-même aucune modification. Ajouté même en grande quantité (15 gouttes par 3 c. c. de lait), il ne produit après 48 heures de contact à 45° ni coagulation ni digestion.

Le sérum, même normal, ajouté en quantité insuffisante pour neutraliser l'action de la trypsine (1 goutte pour 10 gouttes de solution tryptique) produit une modification dans le processus de digestion. La pancréatine seule, en effet, ne coagule pas le lait: il se produit tout au plus un très fin précipité de caséine qui se redissout rapidement. En présence du sérum, il se fait au contraire une véritable coagulation en masse, qui dure peu et est suivie de la fragmentation du coagulum et de sa redissolution. A quoi est dû cet effet présurant?

Faut-il l'attribuer à la pancréatine qui, en présence du sérum, produirait une action coagulatrice plus marquée? Faut-il admettre que l'action de la trypsine met en liberté une présure contenue dans le sérum à l'état latent? Cette dernière explication me semble contredite par le fait que l'adjonction d'une plus grande quantité de sérum neutralise également l'action coagulante. En tout cas, lorsque la quantité de trypsine est grande par rapport à la quantité de sérum, cette coagulation exerce plutôt une action favorable sur le processus digestif. En effet, la digestion d'un tube de lait contenant 10 gouttes de trypsine et 1 goutte de sérum est plus rapidement complète que celle d'un tube ne contenant que les 10 gouttes de solution diastasique.

Si l'on diminue la quantité de diastase par rapport à celle du sérum, on observe le résultat inverse. La coagulation est encore rapide, mais la redissolution est retardée, et arrive même à ne pas se faire complètement, même au bout d'un temps très long.

Enfin, si la dose est suffisante, il ne se produit aucune modification dans le lait qui garde son apparence normale.

Voici les chiffres moyens obtenus avec la même solution diastasique (6 gouttes digèrent 3 c. c. de lait en 1 heure à 45°)

et plusieurs sérums de cobaye neuf. Les écarts entre le pouvoir antitryptique de ces divers sérums étaient du reste peu importants :

Pour une goutte de sérum,	10 gouttes de trypsine :	digestion plus rapide que celle du tube témoin.
—	6 gouttes de trypsine :	digestion en même temps que celle du tube témoin.
—	4 gouttes de trypsine ;	coagulation rapide, mais redissolution ralentie.
—	2 gouttes de trypsine :	coagulation lente, redissolution incomplète, même après 48 heures.
	1 goutte de trypsine :	aucune modification.

Les chiffres précédents expriment le rapport entre le nombre de gouttes de sérum et de solution tryptique ; mais pour ne pas prolonger indéfiniment la réaction, il est préférable, lorsqu'on emploie moins de 4 gouttes de trypsine, d'augmenter la quantité de sérum au lieu de diminuer celle de trypsine, la proportion restant la même.

Action antitryptique du sérum de cobaye vacciné.

Avec le sérum de cobaye vacciné, la marche des phénomènes est la même qu'avec le sérum normal ; mais la dose nécessaire est considérablement moindre. Alors que le sérum de cobaye neuf n'arrive à neutraliser qu'une fois son volume de solution tryptique, j'ai pu obtenir d'animaux vaccinés du sérum neutralisant *in vitro* jusqu'à huit fois son volume de solution tryptique.

Arrivé à ce pouvoir antitryptique, le sang présente d'intéressantes modifications, et l'on peut, par le seul examen du caillot, se rendre compte de la valeur antitryptique du sérum. Le caillot du sang normal contient en effet une substance analogue, sinon identique, à la trypsine. Cette substance en produit la redissolution plus ou moins complète après un temps en général assez long en ce qui concerne le cobaye, si le caillot est conservé aseptiquement dans un tube scellé. Le caillot devient noir, perd sa consistance, et laisse, s'il est suspendu, s'écouler un liquide fortement teinté par de l'hémoglobine plus ou moins altérée.

Le caillot du sang d'un animal fortement vacciné conserve au contraire, dans les mêmes conditions, sa couleur rutilante, et sa consistance pendant un temps indéterminé.

Il est probable que c'est à l'action antitryptique du sérum qu'est due cette action définitive contre les diastases, qui causent l'altération et la redissolution du caillot de sang normal.

En effet, si l'on met dans un petit tube 5 gouttes de sang défibriné de cobaye neuf, et dans un autre 5 gouttes de sang défibriné de cobaye vacciné, qu'on ajoute à chacun 2 c. c. d'eau physiologique et 10 gouttes de solution tryptique, on constate qu'au bout d'une heure, les globules du sang normal sont complètement dissous et l'hémoglobine décolorée en laissant un sédiment noirâtre. Les globules du sang de l'animal vacciné restent au contraire longtemps inaltérés et l'on n'observe pas, même après 24 heures, de changements dans la coloration de l'hémoglobine.

Action préservatrice du sérum de cobaye vacciné.

Le sérum qui exerce son pouvoir antitryptique *in vitro* peut, lorsqu'il est inoculé en même temps que la trypsine, préserver les animaux contre la nécrose. Si l'on ajoute en effet 15 gouttes de sérum de cobaye fortement vacciné à 4 c. c. de solution tryptique, et si l'on inocule ce mélange à un petit cobaye, alors qu'un témoin du même poids présente une escarre à laquelle il succombe rapidement, on observe les phénomènes suivants :

L'animal ne présente aucun phénomène local; la paralysie vaso-motrice, le gonflement font absolument défaut, et le liquide de l'injection est immédiatement résorbé. Mais après une ou deux minutes apparaissent des soubresauts, du tremblement, puis l'animal tombe dans un état de torpeur presque comateuse. Au bout d'une heure, ces phénomènes se dissipent et l'animal retrouve rapidement sa gaieté et son appétit, sans présenter jamais aucun phénomène local au point d'inoculation.

Le sérum agit donc surtout en neutralisant l'action vaso-motrice de la trypsine. Les accidents nerveux observés sont dus soit à la trypsine elle-même, soit à des impuretés de la solution, dont l'absence de réaction locale permet le brusque passage dans la circulation générale.

La faible quantité de sérum dont je disposais ne m'a pas permis d'arriver à des résultats absolument concluants en ce qui concerne l'action préventive ou curatrice du sérum. Je me

propose de combler cette lacune par la vaccination d'animaux plus volumineux que le cobaye.

Action des sérums sur la papaïne.

Toutes les recherches que j'ai faites avec la papaïne sont restées jusqu'ici négatives.

In vitro, l'addition même de quantités considérables de sérum d'animal, immunisé ou non, à la solution de papaïne filtrée sur porcelaine, ne modifie en rien le processus de digestion du lait. qui suit une marche parallèle dans les tubes additionnés de sérum et les témoins.

Les animaux, même fortement immunisés contre la pancréatine. présentent des escarres étendues et succombent à l'injection d'une quantité de papaïne égale à celle qui détermine des accidents semblables chez des témoins de même poids.

J'ai échoué dans toutes les tentatives de vaccination du cobaye contre la papaïne, par la méthode employée pour la pancréatine. Les cobayes supportent l'injection intrapéritonéale de quantités relativement considérables de solution de papaïne (10 c. c. de solution à 5 0/0); mais même après plusieurs injections intrapéritonéales, je n'ai pas observé de modifications dans le processus nécrotique local consécutif à l'injection sous-cutanée.

Action de la chaleur sur le sérum antitryptique.

La question des cytases et des sensibilisatrices donne à l'étude de l'action de la chaleur sur le sérum antitryptique une importance toute spéciale. Elle peut en effet, comme nous allons le voir, fournir des notions de premier ordre en ce qui concerne l'action de la chaleur sur ces corps.

Les conditions de température expérimentées ont été les suivantes : 1° Une heure de chauffage à 55°-56°; le sérum commence à présenter un trouble à peine sensible; 2° une heure de chauffage à 64°-65°; à cette température le sérum de cobaye présente un trouble très accusé, mais il est encore très nettement liquide; 3° une heure de chauffage à 66°-67°; la consistance du sérum devient gélatineuse; 4° une demi-heure à 100°; coagulation complète.

1° *Chauffage à* 55°-56°. — Le chauffage à cette température a

pour résultat un affaiblissement marqué du pouvoir antitryptique du sérum. Après une heure de chauffage, ce pouvoir est réduit d'environ 50 0/0. Cette réduction est proportionnellement égale pour le sérum de cobaye neuf et le sérum de cobaye vacciné.

2° *Chauffage à* 64°-65°. — Le chauffage à cette température fait disparaître complètement le pouvoir antitryptique du sérum ajouté au lait suivant la méthode précédente. On peut ajouter 10 gouttes de sérum pour une goutte de trypsine, sans que la puissance digestive de cette dernière soit le moins du monde modifiée ou même retardée. Pendant toute la durée de la réaction, les tubes contenant le sérum et les tubes témoins présentent le même aspect.

Néanmoins, si l'on ajoute le sérum chauffé, en apparence inactif, du cobaye vacciné, à du sérum d'animal neuf en quantité insuffisante pour neutraliser la trypsine, on constate que le pouvoir antitryptique du mélange est considérablement supérieur à celui du sérum de cobaye seul. Le sérum de cobaye vacciné chauffé a donc agi comme une sensibilisatrice.

Chauffage à 66°-67°. — Après chauffage à cette température, le sérum présente un aspect gélatiniforme et peut être ajouté dans la solution tryptique et même au sérum neuf sans provoquer aucune modification dans la marche de la digestion du lait. Néanmoins, si l'on ajoute à du sérum ainsi gélifié quelques gouttes de solution tryptique (10 gouttes pour 1 c. c.) et que l'on place le mélange au bain-marie à 45°, on observe les phénomènes suivants :

Le sérum de l'animal neuf se trouble presque aussitôt; au microscope, ce trouble apparaît comme formé d'un précipité granuleux et de quelques cristaux minces, carrés, solubles dans l'éther (cholestérine?). Après 12 heures de contact, le chauffage au bain-marie à 100° ne provoque aucune coagulation, et l'examen chimique du liquide montre qu'il s'est formé une quantité notable de peptone.

Dans les mêmes conditions, le sérum de l'animal immunisé ne présente aucun trouble. Après 24 heures de contact avec la trypsine, le chauffage au bain-marie à 100° provoque une coagulation en masse. La trypsine n'a donc exercé sur lui aucune action.

Il résulte de cette expérience qu'un sérum, inactif en appa-

rence lorsqu'on l'ajoute au lait, a néanmoins conservé son pouvoir antitryptique, et qu'il peut se défendre lui-même contre l'action de la trypsine. La substance active n'est donc pas détruite à la température de 67°; elle est simplement immobilisée et ne peut quitter, pour se porter sur une substance, le précipité albumineux dont elle fait partie intégrante. Cette notion, qui n'était jusqu'ici qu'une hypothèse, semble définitivement acquise par l'expérience précitée.

Chauffage à 100°. — Le chauffage au bain-marie (un quart d'heure dans l'eau bouillante) détruit complètement le pouvoir antitryptique du sérum. Le sérum d'un animal immunisé, coagulé à cette température, est digéré par la trypsine dans le même temps que le sérum d'un animal neuf.

Sérum antipancréatique.

L'importance physiologique du pancréas, la différenciation élevée de ses cellules devaient inviter à rechercher l'obtention de cytotoxines antipancréatiques. Il ne semble pas que ni M. Surmont ni M. Carnot soient encore arrivés dans ce sens à des résultats bien précis. Les recherches que j'ai faites, depuis le mois d'octobre 1900, m'ont conduit néanmoins à quelques notions intéressantes pouvant fournir l'explication de certains faits, en apparence contradictoires, observés par ces auteurs.

Je me suis servi de pancréas de chien, broyés aseptiquement et injectés dans le muscle pectoral de l'oie. Les premières injections sont bien supportées, mais les injections suivantes donnent lieu à des escarres pouvant être suivies d'infection mortelle.

Le sérum d'oie ayant reçu des injections de pancréas ne produit chez le chien, en inoculation sous-cutanée, que quelques accidents passagers consistant principalement en tristesse et perte d'appétit. Je n'ai pas fait d'injection intrapancréatique, car les propriétés souvent violemment phlogogènes du sérum d'oie normale me faisaient craindre que les accidents que j'aurais pu observer ne présentassent rien de spécifique.

L'examen *in vitro* de ce sérum est très intéressant. Il possède des propriétés antitryptiques un peu plus marquées que celles du sérum d'oie normale, qui, à ce point de vue, se montre

très irrégulier. Mais surtout il possède la propriété d'accélérer dans de grandes proportions la sécrétion de la pancréatine par les cellules du pancréas frais.

On sait en effet que le pancréas prélevé sur un animal vivant ne contient que peu ou pas de trypsine, et que celle-ci apparaît seulement après un temps plus ou moins long, suivant les conditions de température, d'acidité, etc. L'adjonction, à la macération, de sérum d'oie ayant reçu des émulsions de cellules pancréatiques provoque au contraire, par une véritable cytolyse, la mise en liberté très rapide de la trypsine. Le sérum est donc à la fois antitryptique et trypsinogène.

Ce double pouvoir, joint à la notion des propriétés escarrifiantes de la trypsine, explique les résultats obtenus par M. Surmont, c'est-à-dire la production d'escarres par le mélange de pancréas frais et de sérum antipancréatique. La même sécrétion de trypsine se produisant dans l'organisme doit donner lieu aux nécroses que l'on observe par l'inoculation sous-cutanée de pancréas frais aux animaux ayant déjà reçu de semblables injections, et dont le sérum est devenu trypsinogène.

La trypsine ainsi produite réagit à son tour sur l'organisme, et amène l'augmentation secondaire du pouvoir antitryptique du sérum. Il serait intéressant d'immuniser d'abord fortement l'animal contre la trypsine, puis de lui injecter le pancréas frais : on pourrait ainsi pousser beaucoup plus loin les inoculations, et obtenir peut-être un sérum antipancréatique beaucoup plus puissant.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, j'ai évité autant que possible de sortir de l'exposition simple des faits que j'ai observés. Leur interprétation en effet me semble en découler facilement. L'introduction dans l'économie de la trypsine capable de modifier profondément l'albumine vivante, provoque immédiatement un processus de défense. Ce processus consiste en l'exsudation du sérum du sang sous l'influence d'un processus vaso-moteur. Cette exsudation a pour double effet : 1° de s'opposer à la pénétration de la trypsine; 2° d'en neutraliser ensuite les effets. Si

cette exsudation peut se faire librement comme dans la cavité péritonéale, ce processus de neutralisation peut être atteint par l'action du sérum normal; il peut l'être également dans le tissu cellulaire sous-cutané si la dose de trypsine est modérée. En cas contraire survient la nécrose, qui aboutit également au cantonnement et à l'élimination de l'agent pathogène. A la suite d'attaques répétées, le processus de défense se perfectionne par l'augmentation du pouvoir antitryptique du sérum, dont une beaucoup plus faible quantité suffit à la neutralisation de la trypsine injectée. La réaction locale n'aboutit donc plus à la nécrose, mais à la résorption de la trypsine neutralisée par suite de la disparition de l'action vaso-motrice exercée par la trypsine libre. L'inoculation simultanée du sérum d'animal vacciné et de trypsine en proportions déterminées est en effet résorbée sans aucune action vaso-motrice.

Quant à la manière dont agit le sérum sur la trypsine, elle est entièrement symétrique à l'action des sensibilisatrices, et je trouve le nom d'insensibilisatrices, que donne Mesnil aux substances de cet ordre, très expressif et correspondant bien à l'idée qui me semble résulter logiquement de ces recherches.

DE LA MORPHOLOGIE DU SANG

DES FŒTUS DE LAPIN ET DE COBAYE

ET

DE L'INFLUENCE DE L'INFECTION DE LA FEMELLE GRAVIDE SUR LE SANG DE SES FŒTUS

PAR LE PROF. N. TSCHISTOVITSCH ET LE Dr YOUREWITSCH

(Laboratoire du professeur N. Tschistovitch, à l'Académie impériale de médecine militaire de Saint-Pétersbourg.)

Au cours de la vie intra-utérine, le placenta sert de lien entre le fœtus et la mère. Le sang maternel ne se mêle pas à celui du fœtus dans le placenta : les villosités choriales contenant des capillaires fœtaux nagent dans les sinus veineux de la partie maternelle du placenta. Le sang fœtal est séparé du sang maternel par la paroi du capillaire de la villosité, ainsi que par le revêtement endothélial de cette dernière.

Quand la mère est infectée, les microbes et les toxines qui circulent dans son sang sont séparés, comme par une barrière, du sang fœtal. Cependant cette barrière n'est pas infranchissable; le passage des microbes dans le sang fœtal a été constaté maintes fois (Straus et Chamberland, Perroncito, Charrin et Duclert, Kroner, Malvoz, Arloing, Cornevin et Thomas, Foa et Bordoni-Uffreduzzi, Kruse et Pansini, Lubarsch, etc.)

Il n'est pas rare de voir les microbes pénétrer dans le sang fœtal chez les femelles gravides infectées par le pneumocoque, le staphylocoque et par quelques autres bactéries. Les produits microbiens solubles, les toxines, circulant dans le sang maternel, rencontrent encore beaucoup moins de difficultés à passer à travers les parois des villosités. Ces intoxications intra-utérines expliquent la mort fréquente du fœtus au cours d'une maladie infectieuse de la mère, ainsi que les nombreuses anomalies de

développement (Charrin et Gley et d'autres). On s'est très peu occupé jusqu'à présent de la manière dont le fœtus se défend pendant la maladie maternelle. L'attention des auteurs a été surtout attirée sur le rôle joué par le placenta; c'est à peine si l'on a parlé des processus qui, dans ce cas, ont lieu dans le fœtus lui-même.

Voulant éclairer ces phénomènes complexes, nous nous sommes d'abord mis à étudier les modifications morphologiques que subit le sang fœtal, quand, au cours d'une infection de la mère, les toxines, et parfois les microbes eux-mêmes, passent à travers le filtre placentaire dans le sang fœtal.

La réaction leucocytaire des animaux dans les différentes infections de la vie intra-utérine a été beaucoup étudiée. Elle constitue un phénomène constant et exerce une influence considérable sur l'animal. Ainsi, l'étude de cette réaction dans l'infection pneumococcique a permis à un de nous (déjà en 1891[1]) d'établir la relation entre l'intensité de cette réaction et la virulence du microbe infectant, et de montrer que la propriété que présente l'organisme de réagir contre l'infection par une leucocytose intense est une des conditions essentielles du triomphe de l'animal infecté sur les microbes.

Il a été démontré depuis, par de nombreuses expériences, qu'on peut provoquer des modifications dans le nombre des leucocytes au moyen d'une série de substances très diverses, que ces dernières soient suspendues ou dissoutes dans le sang. La réaction qui suit l'injection intravasculaire d'une de ces substances présente deux phases : celle de diminution du nombre des leucocytes (hypoleucocytose) qui survient immédiatement après l'injection, et celle d'augmentation ultérieure (hyperleucocytose).

Nous n'allons pas discuter ici les causes de ces phénomènes ni le mécanisme de leur origine; cette question compte pour elle seule toute une littérature. Tout en expliquant ces phénomènes de façons différentes, les auteurs reconnaissent leur

1. N. Tschistovitsch, Contribution à l'étude de la pneumonie croupale. De la modification des globules blancs dans la pneumonie, *Gazette d'hôpital de Botkine*, 1891, et *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891.

Idem, Du nombre de leucocytes du sang dans les pneumonies croupales à issue fatale. Communication à la Société des médecins russes, 2 déc. 1893, et *Archives des sciences biologiques*, t. II, nº 5, 1894.

constance, et il serait difficile de méconnaître aujourd'hui que la réaction sanguine est un des phénomènes de défense de l'organisme.

Nous nous sommes demandé si le fœtus réagit également par l'hypoleucocytose et l'hyperleucocytose, au cas où des toxines bactériennes franchiraient la barrière des villosités choriales pour pénétrer dans son sang. C'est pour élucider cette question que nous avons entrepris ce travail. Mais, déjà au commencement de notre étude, nous nous sommes heurtés à cette difficulté, que le sang normal du fœtus des animaux dont on se sert ordinairement pour les expériences de laboratoire est encore très peu étudié. Nous n'avons trouvé quelques données sur la morphologie du sang du fœtus de lapin ou de cobaye que dans les travaux de Cohnstein et Zuntz [1], et dans celui du professeur Hayem [2].

Cohnstein et Zuntz n'ont examiné que les globules rouges des fœtus de chien, de lapin et de cobaye. Ils ont constaté que le nombre des globules rouges est très petit dans la première période de la vie intra-utérine : 1 millimètre cube de sang de fœtus de lapin, de 0 gr. 8 à 2 gr. 6, donnait seulement 376,000 à 500,000 globules rouges. Plus tard, au cours de la vie intra-utérine, le nombre d'érythrocytes augmente petit à petit, pour atteindre 3,200,000 à 4,000,000 chez les fœtus de 43 à 45 grammes. Le sang de fœtus de cobaye, pesant de 25 gr. 5 à 34 gr. 1, comptait de 3,521,700 à 3,498,000 globules rouges par millimètre cube.

On trouve beaucoup plus de détails sur le sang de fœtus de lapin dans le livre du professeur Hayem. Le sang des petits fœtus (20 à 21 milligrammes) est très pauvre en éléments figurés. Les globules rouges, de dimensions et de formes différentes, ne se mettent pas en piles de monnaie. Plusieurs, parmi eux, possèdent des noyaux. Ces derniers sont plus pauvres en hémoglobine que les globules rouges non nucléés. Hayem n'a trouvé que très peu de globules blancs dans le sang des fœtus de lapin. C'étaient des polynucléaires ou bien des mononucléaires à noyaux polymorphes (2me variété de Hayem), ou bien

1. Cohnstein et Zuntz, Untersuchungen über das Blut, den Kreislauf und die Athmung beim Saugethieren-Fœtus, *Archiv f. Physiologie*, Bd. XXXIV, s. 173, 1884.

2. Hayem, *Du sang et de ses altérations anatomiques*, 1889, p. 545.

encore des leucocytes à grosses granulations (3me variété). L'auteur n'indique pas quel était le nombre total des leucocytes, pas plus que les proportions dans lesquelles se trouvaient les différentes variétés.

Étant donné ce peu de faits sur la morphologie du sang des fœtus normaux, nous étions obligés de commencer notre travail par l'étude du sang fœtal normal. Cette étude a surtout porté sur le sang des fœtus de lapin et de cobaye. La première partie de ce travail a été exécutée l'année dernière par l'un de nous en collaboration avec le Dr W. P. Pivovarov [1] et est déjà publiée. Nous devons mentionner ici les principaux résultats de ce travail, sans quoi il serait difficile de comprendre ce qui suit. Nous indiquerons en même temps la manière dont les expériences ont été exécutées, car nous avons suivi la même manière de faire dans notre présent travail.

II

MORPHOLOGIE DU SANG DES FOETUS NORMAUX DE LAPIN

Les lapines pleines subissaient, au cours de la deuxième période de leur grossesse, l'opération césarienne. La corne utérine ouverte, on incisait les membranes fœtales et on recueillait le fœtus dans de la gaze trempée préalablement dans de l'eau physiologique, chauffée pour éviter le refroidissement. Puis, on séchait la peau au niveau des veines transparentes du cou ; on incisait la peau, la veine, et on recueillait un peu de sang qui s'écoulait de la veine, dans le mélangeur, pour compter les globules rouges, en même temps qu'on faisait quelques frottis de sang sur les lames qu'on fixait et colorait ensuite. Pendant toute cette opération, on avait soin de ne pas séparer le fœtus du placenta, mais il arrivait parfois que ce dernier se détachait tout seul de la paroi utérine, et le fœtus commençait à faire des mouvements respiratoires. La prise du sang et la préparation de quelques frottis ne demandaient en tout que quelques minutes.

1. N. Tschistovitsch et W. Pivovarov. Des modifications du sang de lapin pendant la vie intra-utérine et dans les premiers jours qui suivent la naissance, *Archives russes de pathologie*, 1900, et *Archiv f. mikroskopische Anatomie*, 1900.

On comptait les globules sanguins comme d'habitude, au moyen de l'appareil de Thoma-Zeiss. Pour compter les globules rouges, on diluait le sang dans 200 parties de liquide de Hayem[1]; pour les globules blancs, on diluait le sang dans 20 parties d'acide acétique à 1/3 0/0. On comptait sur les champs du microscope préalablement mesurés (objectif D de Zeiss, oculaire 4) et on calculait le nombre des leucocytes sur 5-6 champs au moins. En comptant les globules blancs, nous avons compris également les globules rouges nucléés. Pour préciser d'une façon exacte le nombre des globules blancs, nous avons étudié dans quelles proportions se trouvent ces deux éléments nucléés sur des préparations desséchées et colorées. Connaissant cette proportion, ainsi que le nombre global d'éléments nucléés du sang, il nous a été facile de déterminer le nombre exact des globules blancs et des globules rouges nucléés séparément.

On fixait les frottis de sang d'après Ehrlich à 110-120°, et on les colorait avec le triacide d'Ehrlich (orange G, fuchsine acide et vert de méthyle) modifié par Egorovsky[2].

Nous avons trouvé chez les fœtus de lapin quatre principales variétés de leucocytes :

1° Leucocytes polynucléaires à granulations pseudo-éosinophiles. Les noyaux de ces leucocytes sont nombreux ou polymorphes. Par l'aspect de leurs granulations, ces leucocytes occupent la place intermédiaire entre les neutrophiles et les éosinophiles de l'homme; leurs granulations sont plus nombreuses et plus grandes que celles des neutrophiles, tout en étant plus petites que celles des éosinophiles de l'homme. On en trouve parmi eux quelques-uns possédant de grosses granulations et ressemblant tout à fait à de véritables éosinophiles ;

2° Leucocytes polynucléaires (formes de passage) : grands leucocytes à noyaux multiples ou polymorphes, comme dans la première variété, mais avec un protoplasma tout à fait transparent, incolore ou bien légèrement coloré en rose. Ces leucocytes sont des formes de passage au troisième groupe ;

1. Liquide de Hayem	Eau distillée	200	grammes.
	Chlorure de sodium	1	—
	Sulfate de soude	5	—
	Bichlorure de mercure	0 gr. 5	

2. Egorovsky, *Des Modifications morphologiques des globules blancs des vaisseaux sanguins.* Thèse (en russe), 1894.

3° Grands leucocytes mononucléaires. Grands leucocytes à grand noyau ovale et à protoplasma non granuleux;

4° Lymphocytes. Petits leucocytes à noyau rond et facilement colorable et à protoplasma faiblement accusé sous forme d'une couronne. On rencontre parfois de gros lymphocytes.

On trouve de temps en temps des pseudo-éosinophiles en désagrégation et des polynucléaires vacuolisés.

Le tableau I donne les résultats de l'examen du sang normal des fœtus de lapin.

Nous avons examiné les fœtus, pour la plupart gros, bien formés, longs de 4, 5 à 11 centimètres, et pesant de 24 à 40 grammes. Le poids de ces fœtus était en réalité un peu plus grand, car nous les pesions après une perte considérable de sang.

Le nombre des globules rouges oscille chez eux entre 2,515,000 et 4,391,600 pour 1 millimètre cube. Il y avait dans le nombre de 484 à 2,011 globules rouges nucléés.

Les globules blancs étaient très peu nombreux, de 202 à 1,645 dans 1 millimètre cube. Voici les proportions des différentes variétés de globules blancs :

Polynucléaires pseudo-éosinophiles avec quelques éosinophiles :	41,3 à 62,7 0/0 (152 à 859 pour 1 mm. c.)
Leucocytes à forme de passage.	2,9-12 0/0 (11-132 pour 1 mm. c.)
Grands mononucléaires.....	11,8-28 0/0 (45-291 pour 1 mm. c.)
Lymphocytes.....	4-26,5 0/0 (30- 363 pour 1 mm. c.)

III

MORPHOLOGIE DU SANG DES FŒTUS NORMAUX DE COBAYE

Nous nous sommes servis pour nos expériences de cobayes femelles arrivées à la dernière période de la grossesse, et cela pour opérer, autant que possible, sur de gros fœtus. Comme on le voit sur le tableau II, les fœtus mesuraient en long, du bout du museau à l'extrémité du corps, de $8^{cm},2$ à 11 centimètres; leur poids était de $17^{gr},2$ à $40^{gr},5$. Le plus souvent c'étaient des fœtus presque complètement arrivés à terme. Nous avons suivi la même technique que dans l'étude du sang des fœtus de lapin.

Nous avons voulu classer les leucocytes dans cette étude,

comme dans l'étude précédente pour les fœtus de lapin: mais nous avons constaté que le sang des fœtus de cobaye diffère assez essentiellement du sang de lapin, aussi bien par rapport aux différentes variétés des leucocytes que par rapport à leur aspect extérieur. Comme le fœtus de lapin, celui de cobaye contient très peu de globules blancs. On ne compte que 511 à 1587 de ces derniers dans 1 millimètre cube.

Tandis que le sang des fœtus de lapin contient le plus de polynucléaires pseudo-éosinophiles, celui des fœtus de cobaye ne présente que très peu de leucocytes à protoplasma granuleux, 6 à 30 pour 1 millimètre cube. C'est seulement chez des fœtus arrivés à terme qu'on en trouvait de 122 à 141 par millimètre cube. Ces leucocytes se distinguaient des leucocytes de lapin par leur aspect : les granulations de leur protoplasma étaient ordinairement plus petites et se coloraient non pas en rose, mais en violet (comme les neutrophiles): parfois même les granulations des polynucléaires prenaient la teinte violet foncé (basophiles). Les noyaux des polynucléaires se coloraient beaucoup plus faiblement que ceux des neutrophiles de l'homme.

On ne trouvait que très peu de polynucléaires à protoplasma transparent, sans granulations (formes de passage), de 9 à 34 par millimètre cube; parfois même on n'en trouvait pas du tout.

On comptait déjà beaucoup plus de grands mononucléaires, de 55 à 408 par millimètre cube.

Mais ce sont les lymphocytes qui sont les plus nombreux dans le sang de fœtus de cobaye; ils constituent la principale partie de la masse des globules blancs. On en rencontrait de 298 à 1305.

Voici les proportions dans lesquelles on trouvait les différentes variétés de leucocytes :

Leucocytes polynucléaires à protoplasma granuleux (pseudo éosinophiles, neutrophiles, basophiles)	0,7 — 9,9 0/0
Leucocytes polynucléaires (formes de passage) à protoplasma clair ou à peine coloré	0 — 6,7 0/0
Gros mononucléaires.	9,9 — 42,5 0/0
Lymphocytes.	53,2 — 88,2 0/0

On trouvait toujours dans le sang des fœtus de cobaye, ainsi que dans le sang des fœtus de lapin, des hématies nucléées, bien

qu'en quantité moindre que chez ces derniers. Leur nombre variait de 100 à 906 par millimètre cube.

Le nombre général des globules rouges oscillait entre 4,560,000 et 6,230,000.

IV

MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES DU SANG DES FŒTUS DE LAPIN ET DE COBAYE DANS L'INFECTION DES MÈRES PLEINES PAR LES DIFFÉRENTS MICROBES, AINSI QUE DANS LE COURS D'EMPOISONNEMENT PAR LES TOXINES MICROBIENNES.

Connaissant la morphologie du sang des fœtus normaux de lapin et de cobaye, nous avons entrepris l'étude des modifications que présente le sang des fœtus, lorsque l'animal gravide subit une infection quelconque.

Nous avons conduit nos expériences de la façon suivante :

On comptait les globules blancs du sang pris dans la veine auriculaire de la femelle gravide. Ceci fait, on injectait dans la veine auriculaire, ou bien sous la peau, une culture ou une toxine quelconque. Nous nous sommes servis dans nos expériences des cultures en bouillon du diplocoque de Fränkel, de celles du staphylocoque jaune, du bacille pyocyanique et de la toxine diphtérique [1].

A des dates différentes après le début de l'infection de l'animal, nous recommencions à compter les globules blancs, et si nous trouvions l'hypo — ou l'hyperleucocytose, nous pratiquions l'opération césarienne, en suivant les règles qui sont indiquées plus haut. Les modifications du sang maternel nous indiquaient que la culture microbienne ou bien la toxine injectée par nous avait produit une action évidente sur le sang et les organes hématopoïétiques de la mère. On pouvait donc déjà s'attendre à trouver des modifications correspondantes dans le sang fœtal.

On pratiquait la laparotomie ainsi que l'examen du sang fœtal quelques heures après l'infection ou bien le lendemain matin. Dans un cas, la lapine mère a commencé à mettre bas les petits une heure après avoir reçu une injection intraveineuse de toxine diphtérique. Le sang de ces petits lapins a été étudié immédiatement après leur naissance.

1. On filtrait à travers le filtre Chamberland des cultures en bouillon de veau de bacille diphtérique de 14 jours. 1 c. c. (par kilo de lapin) de cette toxine introduite dans le sang tuait un lapin en 19 heures.

On a examiné en tout le sang de 17 fœtus.

Dans nos expériences sur des lapins, nous pratiquions l'opération césarienne quand les mères présentaient une hyperleucocytose très nette, provoquée dans un cas par l'injection intraveineuse d'une culture en bouillon de 24 heures de diplocoques de Fränkel ; dans un autre, par l'injection intraveineuse de toxine diphtérique. Quant au cas mentionné plus haut, la leucocytose y a été probablement provoquée par l'action simultanée de la toxine diphtérique et du travail d'enfantement.

Dans un cas seulement, on a pratiqué l'opération césarienne sur des cobayes au moment de l'hyperleucocytose survenue à la suite d'une injection sous-cutanée du staphylocoque jaune. Dans les autres cas, cette opération a été exécutée pendant la période d'hypoleucocytose que les cobayes présentaient après l'injection sous-cutanée des cultures en bouillon de bacille pyocyanique et de staphylocoque pyogène doré. Les résultats de nos expériences sont indiqués dans les tableaux III et IV.

Arrêtons-nous d'abord sur les expériences pratiquées sur des lapines mères. Comparons le sang des fœtus de lapines infectées avec celui des fœtus normaux, en prenant pour comparaison, autant que possible, les fœtus de même poids et de même taille. Quant au poids, il faut avoir en vue, comme nous l'avons déjà dit plus haut, qu'il est inférieur au poids réel, et cela pour tous les fœtus en général, à cause de leur plus ou moins grande perte de sang. Il nous a été impossible de peser les fœtus avant la prise du sang, car nous tenions surtout à recueillir le sang le plus vite possible, sans séparer le fœtus du placenta et sans lui donner le temps de se refroidir ; nous voulions, en un mot, nous procurer du sang fœtal non modifié, tel qu'il existe chez le fœtus encore vivant dans la cavité utérine de la mère.

Le tableau I, indiquant la morphologie du sang des fœtus de lapins normaux, nous montre que les fœtus de 30 à 40 grammes et ayant 9 à 11 centimètres de long ont en tout de 266 à 1,645 leucocytes par millimètre cube. Ce dernier chiffre, qui est si élevé, n'a été trouvé que chez un fœtus normal ; chez tous les autres, le nombre de leucocytes variait entre 266 et 835 par mm. c.

Le même fait, nous le constatons dans le tableau III : sur 9 fœtus provenant de lapines infectées avec des diplocoques de Fränkel ou empoisonnées avec la toxine diphtérique, dans un

cas seulement nous trouvons dans le sang fœtal 1,213 leucocytes par millimètre cube; tous les autres fœtus donnaient de 420 à 962. Par conséquent, le nombre général des leucocytes oscillait ici dans les mêmes limites que chez les fœtus normaux.

L'hyperleucocytose des femelles pleines, provoquée par l'infection ou par l'intoxication avec de la toxine bactérienne, n'a pas été suivie de modifications correspondantes dans le nombre des leucocytes du sang fœtal.

Voyons maintenant si la maladie de la mère n'a pas retenti sur le nombre des différentes variétés de leucocytes du sang fœtal.

En examinant les rubriques correspondantes des tableaux I et III, nous constatons des différences considérables dans les nombres de leucocytes d'une même espèce, même chez les fœtus de la même mère, et cela est exact aussi bien pour les fœtus pathologiques que pour les fœtus normaux. Le nombre d'une variété quelconque de leucocytes dans ces deux catégories de fœtus oscillait approximativement dans les mêmes limites. On peut cependant remarquer que les fœtus des lapines infectées donnaient souvent un pourcentage plus considérable de polynucléaires pseudo-éosinophiles et de lymphocytes que les fœtus normaux; mais cette différence était très peu marquée.

Le nombre de globules rouges, ainsi que d'érythrocytes nucléés, ne différait pas non plus de ce que nous avons trouvé chez les fœtus normaux.

Ainsi, dans nos expériences sur les lapins, *le processus toxi-infectieux de la mère n'a pas influé d'une façon essentielle sur les caractères morphologiques du sang de fœtus.*

Passons maintenant à l'examen du sang des fœtus de cobayes infectées par l'injection sous-cutanée de cultures en bouillon de bacille pyocyanique et de staphylocoque doré. Une de ces femelles gravides présentait au moment de l'opération césarienne de l'hyperleucocytose (22,916 par millimètre cube), d'autres de l'hypoleucocytose. (Voir le tableau IV.)

Le nombre général des globules blancs chez tous les fœtus était aussi petit que chez les fœtus normaux (de 502 à 1,314 par millimètre cube); et il était impossible de trouver une relation entre l'état des éléments figurés du sang de fœtus

et celui du sang maternel. Ainsi, par exemple, nous avons trouvé chez un fœtus provenant d'un cobaye opéré dans la période d'hyperleucocytose, 502 leucocytes, et nous en avons constaté presque autant (579 et 594) chez deux fœtus de cobaye opérés dans le stade d'hypoleucocytose.

Ici également, comme pour les lapins, nous trouvons des différences considérables dans la morphologie du sang de deux fœtus issus de la même mère.

Les rapports numériques des diverses variétés de leucocytes diffèrent peu de ce que nous avons vu pour les fœtus normaux de cobaye. Nous avons trouvé très peu de polynucléaires à protoplasme granuleux, encore moins que chez les fœtus normaux. Chez deux fœtus, nous n'avons pas pu déceler la présence de cette variété de leucocytes, malgré l'examen le plus soigné du sang. Il y avait également peu de leucocytes à forme de passage.

Presque tous les leucocytes appartenaient à la variété de lymphocytes, dont le nombre, aussi bien absolu que relatif, a évidemment peu augmenté.

Le nombre des grands mononucléaires a été le même que chez les fœtus normaux.

Les globules rouges ne différaient pas de ceux des fœtus normaux par leur nombre, pas plus que par la quantité d'érythrocytes nucléés.

En réunissant les données que nous a fournies l'étude du sang des fœtus provenant des lapines et des cobayes infectées avec différents microbes ou bien empoisonnées avec la toxine bactérienne, nous trouvons, comme phénomène général, l'absence de modifications morphologiques marquées dans le sang fœtal, au moment même où chez la mère, sous l'influence de l'infection ou de l'intoxication en question, apparaît l'hypo- ou l'hyperleucocytose. Il serait très simple, paraît-il, d'expliquer cette absence de réaction de la part du fœtus, par ce fait que dans nos expériences rien ne passait dans le sang du fœtus. Nous introduisions, en effet, les cultures ou la toxine directement dans le sang ou dans le système lymphatique. Dans le sang de fœtus il n'aurait pu pénétrer que ce qui n'a pas été détruit ou rendu inoffensif dans le sang de la mère et qui n'a pas été retenu par le filtre placentaire. Cette explication nous paraît cependant insuffisante dans notre cas.

Nous avons déjà mentionné les cas de maladie ou de mort intra-utérine de fœtus qui surviennent au cours d'une infection de la mère; nous avons parlé également des recherches expérimentales qui démontrent que le placenta peut être franchi non seulement par les toxines, mais aussi, ce qui n'est pas rare, par les microbes eux-mêmes. Nous avons manqué, justement, quelques expériences à cause de l'action trop violente des toxines sur les fœtus, et de la mort qui frappait ces derniers dans l'utérus même, avant que nous ayons pu examiner leur sang.

Aussi, ne nous restait-il qu'une explication, à savoir que le fœtus ne peut pas manifester de réaction sanguine de défense, ce qui a été déjà supposé par l'un de nous dans le travail mentionné plus haut [1].

Le petit nombre de leucocytes qu'on trouve dans le sang de fœtus au cours de la vie intra-utérine, nous faisait déjà supposer que la défense phagocytaire chez ce dernier est peu développée, et que cette propriété se manifeste surtout au moment de la mise du fœtus au monde. Tant que le fœtus reste dans l'utérus, il est protégé contre les infections par l'organisme maternel, et n'a pas besoin de posséder une armée de phagocytes à lui. Nos recherches actuelles nous amènent à la même conclusion : après avoir fait circuler dans le sang maternel la toxine bactérienne, nous n'avons pas pu déceler du côté du fœtus de réaction morphologique du sang, tant soit peu marquée, bien que le fœtus ait été souvent atteint et que même parfois il périssait.

Nous publierons ultérieurement nos recherches sur le passage dans le sang fœtal des antitoxines, des bactériolysines, des agglutinines et d'autres substances défensives et anti-infectieuses [1].

1. Tschistovitsch und V. Pivovarov, *Arch. f. Mikroskopische Anatomie*, 1900. Dans un travail récemment paru dans les *Archives de sciences biologiques* de Saint-Pétersbourg, C. Dzerjgowski nota un fait très intéressant : le sang des fœtus du cheval, de la chèvre et du chien immunisés contre la diphthérie ne contenait pas d'antitoxines. Se basant sur ce fait, l'auteur conclut que les toxines ne passent non plus dans le sang du fœtus à travers le placenta, puisque dans le cas contraire nous y aurions aussi trouvé les antitoxines. Cette dernière conclusion nous paraît prématurée pour le moment, l'auteur ne nous ayant fourni aucune preuve que le fœtus fût en général capable de produire les antitoxines.

TABLEAU I

FŒTUS DE LAPINS NORMAUX

POIDS et longueur du fœtus.	NOMBRE général de globules rouges.	NOMBRE des globules rouges nucléés.	NOMBRE général de leucocytes	NOMBRE de polynucléaires pseudo-éosinophiles	NOMBRE de leucocytes à forme de passage.	NOMBRE de grands mononucléaires.	NOMBRE de lymphocytes.	0/0 polynucléaires pseudo-éosinophiles.	0/0 FORMES de passage	0/0 gros mononucléaires.	0/0 lymphocytes.
N° 1. Long. 4 c. 5.	2.515.000	1.360	202								
N° 2. Poids 40 gr.	3.545.000	753	624	258	65	150	150	41.3	10.4	21.1	24.1
N° 3. Poids 35 gr.	4.070.000	532	266	152	21	58	35	57.0	8.0	21.8	13.2
N° 4. Poids 30 gr.	4.720.000	889	663	332	47	142	142	48.5	7.1	22.2	22.2
N° 5. Poids 26 gr.	4.175.000	488	380	223	11	45	101	58.7	2.9	11.8	26.5
N° 6. Poids 24 gr.	3.005.000										
N° 7.		555	515	299	96	108	61	58.4	6.9	23.0	11.9
N° 8.	3.360.000	484	470	295	24	112	39	62.7	5.1	23.9	8.3
N° 9. Poids 40 gr. Long. 10 c. 5.	3.875.000	1.018	740	444	59	207	30	60.0	8.0	28.0	4.0
N° 10. Poids 30 gr. Long. 10 c. 5.	4.391.600	2.011	735	343	69	183	160	45.4	9.1	24.2	21.2
N° 11. Poids 30 gr. Long. 10 c.		699	1.645	859	132	291	363	52.2	8.0	17.7	22.1
N° 12. Poids 40 gr. 2. Long. 11 c. 5.	4.650.000	1.704	835	428	102	124	181	51.3	12.2	14.8	21.6

Le fœtus n° 1 vient de la 1re lapine, les fœtus nos 2 et 3 viennent de la 2e, nos 4 et 5 de la 3e, nos 6 et 7 de la 4e, nos 9, 10, 11 et 12 de la 5e.

TABLEAU II

FŒTUS DE COBAYES NORMAUX

POIDS et longueur du fœtus.	NOMBRE général de globules rouges.	NOMBRE de globules rouges nucléés	NOMBRE général de leucocytes.	NOMBRE de polynucléaires à protoplasma granuleux.	NOMBRE de leucocytes à forme de passage.	NOMBRE de gros mononucléaires.	NOMBRE de lymphocytes.	0/0 de leucocytes granuleux.	0/0 de leucocytes à forme de passage.	0/0 gros mononucléaires.	0/0 lymphocytes.
N° 1. Long. 8 c. 8. Poids 19 gr. 5.	5.170.000	280	830	6	30	333	441	0.7	3.6	42.5	53.2
N° 2. Long. 9 cent. Poids 19 gr. 7.	4.560.000	411	769	24	32	185	528	3.0	4.1	24.2	68.6
N° 3. Long. 9 cent. Poids 19 gr. 8.		788	952	29	15	343	565	3.1	1.6	36.0	59.3
N° 4. Long. 9 cent. Poids 17 gr. 2.		809	511	11	32	170	298	2.1	6.3	33.3	58.3
N° 5. Long. 8 c. 2. Poids 18 gr. 5.	4.880.000	737	1.068	0	9	408	651	0	0.8	38.2	61.0
N° 6. Long. 8 cent. Poids 18 gr. 2.		906	517	0	34	115	367	0	6.7	22.2	64.4
N° 7. Long. 11 cent. Poids 40 gr. 5.	5.966.000	184	1.587	122	0	160	1.305	7.7	0	10.1	82.2
N° 8. Long. 11 cent. Poids 35 gr.	6.230.000	240	628	19	0	55	554	3.0	0	8.8	88.2
N° 9. Long. 10 cent. Poids 38 gr. 5.	4.833.000	100	1.427	141	0	141	1.145	9.9	0	9.9	80.2

Les fœtus nos 1, 2, 3, proviennent de la première cobaye femelle, les nos 4, 5 et 6 de la 2e, les nos 7, 8 et 9 de la 3e.

TABLEAU III

FŒTUS DE LAPINES INFECTÉES

Poids et longueur des fœtus.	Nombre général de globules rouges.	Nombre de globules rouges nucléés.	Nombre général de leucocytes.	Nombre de polynucléaires pseudo-éosinophiles.	Nombre de leucocytes à forme de passage.	Nombre de gros mononucléaires.	Nombre de lymphocytes.	% polynucl. pseudo-éosinophiles.	% leucocytes à forme de passage.	% gros mononucléaires.	% lymphocytes.	
N° 1. Long. 10 cent. Poids 35 gr.	3.980.000	687	541	328	16	49	148	60.6	3.0	9.1	27.3	*Expérience VI.* — A 9 heures du matin on trouve dans le sang de la veine auriculaire 9,449 leucocytes par mill. cube. A 9 h. 50, injection intraveineuse de toxine diphtéritique. 10 h. 55. Commencement de l'accouchement. 2 fœtus sont nés; ils donnent 11,124 leucocytes par mill. cube. Puis naissent encore 2 fœtus. Leur sang a été examiné immédiatement après la naissance.
N° 2. Long. 9 c. 5. Poids 32 gr.	4.120.000	590	600	445	29	29	97	74.2	4.8	4.8	16.1	
N° 3. Long. 10 c. 5. Poids 39 gr.		1.552	420	152	54	22	192	36.2	12.8	5.3	45.7	
N° 4. Long. 10 c. 5. Poids 35 gr. 4.	3.712.500	367	466	354	19	13	80	76.0	4.0	2.7	17.3	*Expérience VII.* — A 9 heures du matin on trouve dans le sang de la veine auriculaire de lapine 9,672 leucocytes. A 9 h. 35, injection intraveineuse de 1/2 c. c. de culture en bouillon de diplocoque de Fränkel. A 11 h. 45, 12,612 leucocytes. A 1 h. 15, opération césarienne et examen du sang du fœtus.
N° 5. Long. 9 c. 4. Poids 32 gr. 1.	3.157.600	746	746	372	42	42	149	68.6	5.7	5.7	20.0	
N° 6. Long. 10 c. 9. Poids 36 gr. 6.		597	653	451	11	45	146	69.0	1.7	6.9	22.4	
N° 7. Long. 10 c. 5. Poids 41 gr. 7.	3.840.000	1.205	1.213	821	66	56	270	67.7	5.4	4.6	22.3	*Expérience VIII.* — A 10 heures du matin on trouve dans le sang de la veine auriculaire 9,134 leucocytes. A 10 h. 13, injection intraveineuse de 1/3 de c. c. de toxine diphtéritique. A 6 heures du soir, on trouve dans le sang de la veine auriculaire 13,802 leucocytes par mill. cube. Immédiatement après cet examen, opération césarienne et examen du sang fœtal.
N° 8. Long. 9 c. 5. Poids 37 gr. 7.	4.012.500	1.364	962	671	21	108	162	69.7	2.2	11.2	16.9	
N° 9. Long. 10 cent. Poids 43 gr. 7.	4.290.000	1.363	536	268	14	89	165	50.0	2.6	16.6	30.8	

Les fœtus n°s 1, 2 et 3 proviennent de la 1re lapine, les n°s 4, 5 et 6 de la 2e, les n°s 7, 8 et 9 de la 3e.

TABLEAU IV

FŒTUS DE COBAYES INFECTÉES

Poids et longueur des fœtus.	Nombre général de globules rouges.	Nombre de globules rouges nucléés.	Nombre général de leucocytes.	Nombre de polynucléaires granuleux.	Nombre de leucocytes à forme de passage.	Nombre de gros mononucléaires.	Nombre de lymphocytes.	0/0 polynucléaires granuleux.	0/0 leucocytes à forme de passage.	0/0 gros mononucléaires.	0/0 lymphocytes.	
N° 1. Long. 4 c. 5. Poids 4 gr. 1.		11.307	502*									*Expérience III.* — Le 16/III, à 1 h., on trouve dans le sang de cobaye 11,910 leuc. Inj. sous-cutanée de 1/3 de c. c. de culture de bouillon de staphylpyogène doré. Le 17/III matin, avant l'opération césarienne, 22,816 leuc.
N° 2. Long. 10 c 4. Poids 36 gr.	4.389.600	1.898	594	0	85	65	444	0	14.2	11.0	74.8	*Expérience IV.* — 28/III à 10 h. matin, dans le sang veineux de cobaye pleine 10,074 leuc. Inj. sous-cutanée de 1/3 de c. c. de culture en bouillon de bacille pyocyanique. 29/III matin av. l'opération 2,976 leuc. par mil. c.
N° 3. Long. 10 c. Poids 35 gr 2.	5.485.000	1.861	1.189	14	86	200	889	1.2	7.2	16.8	74.7	
N° 4. Long. 11 c. 8. Poids 42 gr. 7.	5.410.000	137	1.344	138	59	39	1.078	10.5	4.5	3.0	82.0	*Expérience V.* — Le 3/IV à 10 h. matin dans le sang de cobaye 7,366 leuc. A 11 h. 45 inj. sous-cutanée de 1/2 c. c. de culture en bouillon de staphyl. pyogène doré. Le 4/IV 9 h. matin av. l'opération, 2,120 leuc. par mil. c.
N° 5. Long. 11 c. 6. Poids 40 gr. 3.	6.320.000	417	1.033	44	44	69	876	4.2	4.2	6.7	84.8	
N° 6. Long. 11 c. 5. Poids 37 gr. 4.	5.633.000	46	579	24	12	57	486	4.0	2.0	10.0	84.0	*Expérience X.* — Le 4/VI à 10 h. matin. dans le sang de cobaye pleine 8,259 leuc. Inj. sous-cutanée de 1/3 dec.c. de culture en bouillon de bacille pyocyanique. A 12 h. 55 3,534 leuc. par mil. c. de sang. Immédiatement l'opération césarienne et l'examen du sang fœtal.
N° 7. Long. 12 c. Poids 39 gr. 2.	6.010.000	123	641	62	0	24	555	9.6	0	3.8	86.5	
N° 8. Long. 12 c. Poids 41 gr. 5.	6.041.000	95	1.433	109	13	40	1.271	7.6	0.9	2.8	88.7	

* Il a été impossible de préciser le nombre de leucocytes de chaque variété dans ce cas, car on n'a pu compter que trop peu de leucocytes sur des préparations desséchées.

Le fœtus n° 1 provient de la 1re cobaye, les nos 2 et 3 proviennent de la 2e, les nos 4 et 5 de la 3e et les nos 6, 7, 8 de la 4e.

SUR L'IMMUNITÉ DES PIGEONS ET DES COBAYES

VACCINÉS CONTRE LE CHARBON

ET SUR LES PROPRIÉTÉS DE LEUR SÉRUM

PAR JACQUES DE NITTIS

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Sous l'inspiration de M. Metchnikoff, nous avons vacciné contre le charbon, d'une part, des pigeons — espèce réfractaire que la bactéridie tue difficilement — et, d'autre part, des cobayes, animaux si réceptifs que les auteurs considèrent leur vaccination comme impossible.

Ces animaux étant vaccinés solidement, nous leur avons pris du sérum pour en étudier les propriétés spécifiques.

***

Vaccination du pigeon.

La vaccination du pigeon ne présente pas de difficultés, vu l'immunité naturelle. Toutefois, cette vaccination est réelle, c'est-à-dire qu'un pigeon vacciné survit à l'injection d'une dose de culture charbonneuse mortelle pour le témoin.

Nous avons commencé la vaccination par le premier ou le deuxième vaccin de Pasteur.

Un animal vacciné brutalement par de seules injections virulentes nous a fourni, peut-être par hasard, un sérum peu actif; mais, ayant surtout en vue de maintenir la similitude entre la vaccination de certains de nos pigeons et de certains de nos cobayes, les inoculations de bactéridies atténuées s'imposaient pour les animaux de l'espèce réfractaire, puisque ces inoculations étaient indispensables à l'immunisation des cobayes.

Les pigeons jeunes maigrissent notablement sous l'influence

du deuxième vaccin de Pasteur. Nos injections étaient pratiquées sous la peau ; les dernières seules étaient intra-musculaires. En général, l'œdème, au cours de l'immunisation, était imperceptible et il était à peu près impossible de retirer des bactéridies vivantes plus de 24 ou 30 heures après l'injection sous-cutanée.

Vaccination du cobaye.

La vaccination du cobaye est une opération longue et délicate; avec la méthode des vaccins atténués, on n'obtient le résultat cherché qu'après 2 mois au moins ou 3 mois; peut-être même. malgré toutes les précautions, est-il inévitable de perdre quelques animaux.

La difficulté est de passer d'un vaccin à l'autre, et surtout du deuxième vaccin au charbon virulent. Aussi, avons-nous entretenu des cultures de deuxième vaccin ayant subi 1 ou 2 passages; cet échantillon possède la virulence exactement nécessaire pour tuer les cobayes neufs à dose infinitésimale : il nous a donc été précieux non seulement pour les vaccinations, mais pour certaines recherches d'atténuation.

Une bonne vaccination doit se faire sans déterminer de gros œdèmes ; le poids et la température peuvent varier notablement.

Une diminution brusque du poids en 4 ou 5 jours a généralement précédé la mort par broncho-pneumonie charbonneuse, (nous avons vu le fait se produire dès les injections du deuxième vaccin). Dans ces cas malheureux, le cobaye meurt avec un écoulement de sang par les narines, le poumon est congestionné totalement et atélectasique ; dans l'infarctus hémorragique de la plèvre (parfois accompagné de péricardite), on trouve de nombreuses bactéridies et des cellules éosinophiles.

Après chaque injection nouvelle, au cours de la vaccination, il doit se faire une phagocytose active : au bout de 24 heures, on doit retirer avec peine une petite quantité d'exsudat sanguinolent, où l'on trouve de très nombreux polynucléaires, et où ne subsistent que de rares bactéridies vivantes. Au bout de 48 heures, si l'on enfonce une pipette à travers l'orifice même de l'injection, on ne doit plus trouver de bactéridies, ni à l'examen microscopique ni par les cultures.

La vaccination d'un cobaye, prudemment conduite, dure deux mois au minimum; nous avons généralement vu s'écouler

trois mois jusqu'au moment où l'animal supportait de fortes doses de charbon virulent.

La vaccination doit être commencée prudemment : deux cobayes ayant déjà supporté 1/10 puis 1/3 de c. c. de premier vaccin (en culture de 24 heures), sont inoculés le 2 mars avec 1/2 c. c. de premier vaccin de Pasteur (en culture), en même temps qu'un cobaye neuf; les deux vaccinés se comportent de la façon ci-dessus décrite, tandis que l'animal neuf meurt en 4 jours avec un gros œdème.

Il ne sert à rien de vouloir sauter les étapes intermédiaires : le 15 mars un cobaye neuf, exceptionnellement résistant, reçoit 1/2 c. c. de deuxième vaccin; il a un œdème énorme qui s'ulcère; finalement l'animal se rétablit, mais au bout de deux semaines il meurt d'une nouvelle injection que supportent sans dommage les cobayes lentement amenés à supporter 1/2 c. c. de deuxième vaccin.

Après chaque injection, la température baisse légèrement avec le poids, puis remonte.

Nous avons aussi vacciné quelques cobayes avec des cultures asporogènes; c'est surtout le début de l'immunisation qui se trouve ainsi simplifié; mais la difficulté d'obtention et d'entretien d'échantillons à virulence déterminée nous ont engagé à recourir plutôt au charbon ordinaire. Du reste, les cultures de vaccin et de bactéridie ne commencent à sporuler, en bouillon, qu'après 48 heures.

Quant à l'immunité finalement atteinte, elle est considérable.

Le résultat paradoxal obtenu avec le sérum nous engageait à pousser la vaccination aussi loin que possible.

Un de nos cobayes a supporté la dose considérable de 1/2 c. c. d'une culture de 48 heures d'une bactéridie recueillie à l'autopsie d'un mouton charbonneux. Deux jours après, on ne retrouvait plus de bactéridies au point d'inoculation; tandis que le témoin, plus lourd, était mort en 30 heures à peu près.

En général nos cobayes supportaient finalement de 5 à 10 gouttes de culture virulente en bouillon.

Exemples de vaccination de cobayes :

Février.	*Cobaye marqué d'une tache rouge sur le dos.*		*Cobage marqué d'une croix bleue sur le dos.* (*Fin de la vaccination.*)
22	595gr, 36°5, reçoit 2 gouttes premier vaccin.	15 avril.	925gr, 1/8 c. c. charbon vir.
23	580gr, 36°,7 petit œdème.	17	880gr.
24	600gr, 37°,2, id.	27	920gr, 1/4 c. c. charbon vir.
27	600gr, 1/3 c. c. 1er vaccin.	29	900gr.
28	590gr, 36°,7.	5 mai.	900gr, 1/3 c. c. charbon vir.
2 mars.	605gr, 0,5 c. c. 1er vaccin.	15	910gr, 1/2 c. c. charbon vir.
10	650gr, 1/5 c. c. 2e vaccin.	8 juin.	2/3 c. c. charbon vir.
15	630gr, 36°,4. 0,4 c. c. 2e v.	20	910gr, 1 c. c. charbon vir.
17	680gr, 36°,7.	24	835gr.
20	670gr, 0,7 c. c. 2e vaccin.	5 juillet.	Un peu de culture charbonneuse provenant d'un jeune pigeon.
22	680gr, un peu d'œdème 38°,7.	22	Saignée.
24	670gr, idem, 37°,9.		
25	690gr.		
28	695gr, 37°,8, 1 c. c. 2e v.		
1er avril.	675gr, 38°.		
6	1/5 c. c. 2e vaccin.		
15	685gr, 1/4 c. c. de 2e vac. Ayant passé par l'animal.		
25	705gr, 1/5 c. c. charbon virulent.		
26	690gr.		
27	700gr.		
2 mai.	720gr, 8 gouttes charb. vir.		
15	Saignée.		

Quand nous avons ainsi disposé d'animaux vaccinés, nous avons cherché ce que devenait la virulence des bactéridies injectées, et nous avons expérimenté les propriétés du sérum.

II

RECHERCHES SUR L'IMMUNITÉ DES PIGEONS VACCINÉS ET SUR LES PROPRIÉTÉS DE LEUR SÉRUM

A. — Pour savoir ce que devenait la virulence des bactéridies injectées aux pigeons vaccinés, nous avons injecté la même dose de culture à un pigeon neuf d'une part, à un pigeon vacciné de l'autre, puis, au bout de 9, 15 ou 24 heures, nous avons repris avec une pipette un peu de liquide à chacun des pigeons, et en avons injecté respectivement à deux séries d'animaux sensibles.

Expérience I. — Le 5 avril 1900, vers 8 heures, nous injectons 1 c. c. de culture virulente (en bouillon, 20 heures d'étuve, puis bien émulsionnée) à un pigeon vacciné et à un pigeon neuf.

La bactéridie est reprise le soir même vers 5 heures au point d'inoculation et injectée à deux souris, après vérification de la présence de la bactéridie.

Liquide retiré du pigeon (aile gauche marquée de rouge) vacciné.	Liquide retiré du pigeon (aile gauche marquée de bleu) neuf.
Injecté le 5 au soir à une souris marquée de rouge.	Injecté le 5 au soir à une souris marquée de bleu.

Les deux souris sont trouvées mortes le 7 au matin.

Expérience II. — 6 novembre 1899.

Pigeon vacciné (émulsion de 1/6 de culture de 24 heures sur gélose.) Le 7 (15 heures après), l'exsudat retiré est injecté à un cobaye et à une souris marquée de rouge.	Pigeon vacciné neuf (émulsion de 1/6 de culture de 24 heures sur gélose.) Le 7 (15 heures après), l'exsudat retiré est injecté à un cobaye et à une souris marquée de bleu.
La souris est trouvée morte le 8, après midi. Le cobaye meurt dans la matinée du 9 (en 48 heures).	La souris meurt le 8, vers 5 heures (en 32 heures). Le cobaye est trouvé mort le 9 au matin.

L'autopsie a montré les bactéridies dans le sang; de plus, l'œdème au point d'inoculation des animaux de la *série rouge* ne présentait que la phagocytose insuffisante et tardive qu'on ne peut confondre avec celle qui survient chez les animaux traités par le sérum de pigeon vacciné : ce qui prouve que la petite quantité d'humeurs de pigeon vacciné n'avait pas exercé d'influence notable sur le résultat.

Nous avons souvent échoué lorsque nous avons tenté de puiser du liquide chez le pigeon, 24 heures après l'inoculation : nous n'avons pas pu retrouver de bactéridies.

Il en a été de même quand nous avons essayé de reproduire l'expérience précédente avec des échantillons atténués de bactéridies. Avant d'injecter aux animaux réactifs l'exsudat retiré des pigeons, nous faisions une préparation avec la dilution de cet exsudat dans l'eau salée à 7 0/00, et nous injections de ces dilutions des volumes inversement proportionnels à la richesse approximativement constatée.

Jamais nous n'avons pu constater, quelque minime que fût la dose injectée aux animaux réactifs, une atténuation quelconque du charbon injecté aux pigeons vaccinés ; nous ne pouvons dire non plus si la bactéridie s'est exaltée davantage dans l'organisme des pigeons vaccinés : les essais devaient être pratiqués avec du charbon virulent et nous ne pouvions, chez le pigeon, avoir recours à l'artifice employé pour le cobaye.

La seule certitude est que, à dose minime, la bactéridie passée par le pigeon vacciné tuait les souris et les cobayes aussi vite que la bactéridie provenant d'un pigeon neuf.

B. — Nous avons cultivé la bactéridie comparativement dans le sérum des pigeons vaccinés et dans le sérum des pigeons neufs; les deux cultures ainsi obtenues étaient ensuite lavées sur un filtre de papier buvard spécial, puis les bactéridies restées sur le filtre étaient émulsionnées, et les émulsions ainsi obtenues injectées à deux animaux, en quantité inversement proportionnelle à leur richesse.

Les premiers essais n'ont pas donné de résultat bien net : les cultures de bactéridie en immun-sérum et en normal-sérum de pigeon, après 24 heures de culture, tuaient à peu près dans les mêmes délais, ou du moins la survie ne dépassait guère les hasards possibles.

Nous avions uniquement pour but de comparer la virulence de ces cultures en sérum; aussi, habituellement, ne faisions-nous même pas la comparaison avec une culture contemporaine en bouillon. Deux expériences préalables nous avaient appris que le sérum de pigeon normal est très légèrement bactéricide, sans jamais déterminer dans les cultures la mort ni la déformation des bactéridies, qui prenaient bien la couleur.

Les cultures faites en sérum normal et en immun-sérum de pigeon présentent de légères différences morphologiques.

La culture en normal-sérum est louche, composée de petits bacilles grêles en chaînes assez longues parfois; en immun-sérum, la culture, limpide avec un dépôt, montrait au microscope des bactéridies un peu plus épaisses. Les spores apparaissent plus tardivement que dans le bouillon, et en premier lieu dans le normal-sérum.

Abandonnées une vingtaine de jours à la température ordinaire, puis chauffées à 72° pendant 10 minutes dans des tubes capillaires, les cultures ensemencées se développent : celle qui provient de normal-sérum donne de petits bacilles rectilignes, celle de l'immun-sérum des chaînettes courbes de plusieurs bacilles (cette forme correspondrait assez exactement aux résultats obtenus quant à l'atténuation).

Quant à l'agglutination, déjà étudiée par d'autres, nous l'avons examinée en gouttes pendantes sur des émulsions de premier vaccin (le charbon virulent ne pouvant être émulsionné).

Le sérum de pigeon normal dépourvu de tout élément cellulaire n'agglutine pas.

Le sérum de pigeon vacciné agglutine en 10 minutes, à la proportion de 1 pour 50 d'émulsion (on pourrait sans doute suivre le phénomène plus loin, mais il faut, pour la bactéridie, se défier des mesures précises en matières d'agglutination).

L'action du sérum de pigeon vacciné par rapport à celle du sérum de pigeon normal n'étant pas apparue dans les conditions des expériences précitées, nous avons voulu prolonger le temps de contact et opérer avec des échantillons moins virulents.

Nous avons ensemencé 1 goutte de sang charbonneux (c'est-à-dire dépourvu de spores) simultanément dans un petit tube d'immun-sérum de pigeon et dans un tube de sérum de pigeon neuf; les deux cultures étaient ensuite faites à 42° pour éviter la formation des spores, sur lesquelles il était permis de supposer que le sérum n'eût pas exercé d'action.

Si on laisse les cultures (ensemencées d'un échantillon de bactéridie dont 1 anse tue un cobaye moyen en 36 heures) à 42° pendant 5 jours, on les amène à la limite où leur injection tue le cobaye à petite dose, c'est-à-dire que la moindre cause d'atténuation surajoutée enlève toute virulence.

Dans l'espèce, les cultures en sérum normal, après lavage, tuent encore le cobaye, tandis que les cultures en sérum spécifique ne le tuent plus.

Expérience I. — Les cultures en sérum spécifique et en sérum normal avaient été ensemencées le 21 février avec le sang d'un cobaye mort du charbon (voir *Expérience IV* avec le sérum de pigeon), puis laissées à 42° jusqu'au 26, et ensuite abandonnées à la température du laboratoire, enfin lavées sur buvard. Les émulsions grossièrement numérées au microscope sont injectées en raison inverse de leur richesse.

1er mai 1900.	Cobaye marqué de rouge, émulsion de bactéridies provenant du sérum de pigeon vacciné.	Cobaye marqué de bleu, émulsion de bactéridies provenant du sérum de pigeon vacciné normal.
4 mai.	Survit indéfiniment.	Trouvé mort le dimanche matin, 4 mai. Autopsie typique.

Expérience II. — 15 mars 1900. Cultures en sérum laissées à 42° depuis le 12. De 10 heures du matin à 4 heures du soir, le 15, ces cultures sont déposées dans un filtre de porcelaine mince, stérilisé, et qui baigne dans un courant d'eau salée à

7 0/00 dont le niveau est maintenu un peu plus élevé que celui des cultures dans le filtre[1].

15	Souris marquée de rouge, reçoit 1/3 de goutte de culture en immun-sérum de pigeon.	Souris marquée de bleu, reçoit 1/2 goutte (émulsion moins riche) normal-sérum de pigeon.
17	Survit indéfiniment.	Trouvée morte le 17 au matin. Autopsie typique.

Expérience III. — Un nouvel essai, sur 2 cobayes, a donné une survie de 40 à 45 heures pour l'animal inoculé de la culture en sérum normal, et de 70 à 80 heures pour l'animal inoculé avec les bactéridies de l'immun-sérum.

Expérience IV. — Une expérience a été nulle en ce que les deux souris sont mortes en 30 heures. (Celle qui avait reçu la culture en immun-sérum serait même morte avant l'autre.)

Expérience V. — Plutôt que d'atténuer la bactéridie par un séjour à 42°, nous avons voulu opérer sur un animal moins sensible au charbon, sur le lapin.

Des cultures ensemencées le 14 sont laissées 2 jours à l'étuve à 36°, lavées le 16 et injectées. (1/2 c. c. de culture en sérum est étendu de 3 c. c. d'eau, et nous injectons 1/2 c. c. de cette dilution, soit 1/14 de c. c. de la culture.)

16 février 1900.	Lapin gris, 1,800gr, reçoit la culture de l'immun-sérum.	Lapin gris, collier blanc, 2,000gr, reçoit la culture du normal-sérum.
17		Meurt du charbon, le soir, (36 heures).
18	Meurt dans la journée (de 48 à 55 heures) du charbon.	

Expérience VI. — Mais un des essais a été pratiqué avec le sérum d'un pigeon préparé d'une façon spéciale; ce pigeon avait reçu pour la première fois, 7 ou 8 jours auparavant,

1. Nous avons essayé ce dispositif pour que la culture se trouve lavée sans l'obligation de recueillir les bactéridies avec un pinceau sur un filtre qui lui abandonne toujours des fragments de papier; de plus, ce dispositif nous paraissait exposer à moins de chances de contamination. Le liquide lavé (nous avons choisi exprès un sérum un peu chargé d'hémoglobine pour nous fixer sur la valeur du procédé) était encore vaguement rouge, et l'on voyait au microscope des globules rouges, un peu crénelés. On peut penser que le lavage, dans ces conditions, a été insuffisant, mais la dose injectée aux animaux était si faible que cette insuffisance de lavage ne pouvait influencer le résultat. En effet, le sérum spécifique du pigeon n'agit qu'à la dose minima de 5 gouttes; les essais pratiqués avec 1 ou 2 gouttes n'ont jamais sauvé les souris. Or, dans l'expérience que nous décrivons, nous n'avons injecté qu'un tiers de goutte, en sorte que la quantité de sérum introduite était négligeable même dans l'hypothèse d'un lavage nul des cultures.

une dose massive de culture charbonneuse ; le sérum que nous lui avons pris n'avait pu, à la dose de 1 c. c., protéger une souris blanche contre la mort par le deuxième vaccin ayant subi deux passages. Ce sérum était donc inactif au point de vue de l'immunité, et pourtant il a nettement atténué la bactéridie que nous y avons cultivée.

Le 29 mars 1900, la bactéridie virulente et sans spores a été ensemencée simultanément dans un tube de sérum de pigeon neuf et dans un tube de sérum du pigeon dont nous venons de parler. Le 2 avril, ont eu lieu les inoculations.

2 avril.	Cobaye marqué de jaune, reçoit une petite quantité de culture lavée du sérum de pigeon normal.	Cobaye marqué d'éosine, reçoit une petite quantité de culture lavée du sérum de pigeon préparé.
5	Survit indéfiniment.	Trouvé mort le 5. Autop. typique.

Il semblerait donc que le pouvoir atténuant, au moins pour ce qui concerne le charbon, dépend plus de la race des animaux sérumifères que de leur immunité.

C. — Sérum de pigeon vacciné. — Le 17 juillet 1899, à un pigeon vacciné (inoculé pour la dernière fois le 30 juin), nous avons pris du sang en même temps qu'à un pigeon neuf.

Le 18 juillet, nous avons injecté 3 souris avec une émulsion de deuxième vaccin ayant subi 2 passages; chacune reçoit 1/4 d'anse ; en outre la souris marquée de bleu reçoit 1/2 c. c. de sérum de pigeon vacciné, la souris sans marque reçoit la même quantité de sérum de pigeon normal.

Les résultats sont contenus dans le tableau suivant :

Expérience I. — Virus et culture injectés en des endroits éloignés, mais en même temps.

17 juillet.	Souris tache bleue Virus. + 1/2 c. c. immun-sérum de pigeon.	Souris sans marque Virus. + 1/2 c. c. normal-sérum.	Souris tache rouge Virus seul.
19	Survit indéfiniment.	Morte en 24 heures, bactéridie.	Morte en 24 heures, bactéridie.

Expérience II. — 30 août 1899. Sérum et culture injectés en des points éloignés à peu de temps d'intervalle.

	Souris tache rouge.	Souris tache bleue
30 août.	12 gouttes d'immun-sérum pigeon + émulsion de bactéridies.	12 gouttes normal-sérum pigeon + émulsion de bactéridies.
31	Survit indéfiniment.	Morte en 26 heures. Autopsie typique.

Expérience III. — 5 gouttes de cultures charbonneuses de 42 heures sont diluées dans 5 c. c. de bouillon.

D'autre part, dans deux verres stériles sont versés 5 c. c. de sérum normal et 5 c. c. de sérum spécifique. Chacun de ces verres reçoit en outre 5 c. c. de l'émulsion de bactéridies.

30 octobre.	Cobaye tache rouge, 360gr, sérum normal et bactéridies.	Cobaye tache bleue, 400gr, bactéridies seulement.	Cobaye sans marque, 370gr, immun-sérum et bactéridies.
1er novembre.	Mort dans la journée du charbon.	Mort dans la journée du charbon.	Survit indéfiniment.

Expérience IV. — Une expérience du 28 juillet 1899 a donné un résultat nul. Le cobaye témoin aussi bien que les animaux inoculés de normal et d'immun-sérum ont été trouvés morts au bout de 40 heures. La quantité de culture charbonneuse (1/2 c. c.) était trop forte.

Expérience V. — Le 19 février 1900, 2 cobayes sont inoculés de 1/3 de goutte d'une culture de 40 heures de charbon virulent, et, à une autre partie du corps, de sérum de pigeon.

19 février.	Cobaye roux, marqué d'un numéro à l'oreille, 430gr. Sérum, pigeon neuf.	Cobaye marqué d'une tache d'éosine, 400gr. Sérum pigeon vacciné.
20	385gr, œdème.	390gr.
21	Mort. Autopsie typique.	
1er mars.		Vivant.

Le sérum de pigeon est donc réellement efficace pour protéger les cobayes et les souris contre la dose mortelle de virus charbonneux, à condition que cette dose ne soit pas trop grande.

Or, au moyen des autres espèces animales, on n'avait guère obtenu de sérum spécifique capable de protéger les souris ni les cobayes. Les résultats positifs de Marchoux et de Sclavo ont été contredits par Sobernheim qui, de son côté, n'a pas réussi davan-

tage à obtenir un sérum capable d'entraver l'infection des souris ni des cobayes.

Ce dernier auteur n'a pas vu la phagocytose s'accroître chez les lapins inoculés de virus charbonneux et traités par le sérum spécifique de moutons vaccinés. La phagocytose était au contraire frappante chez les cobayes : si dans l'œdème prélevé 24 heures après l'inoculation, on trouve des bactéridies abondantes et peu de phagocytes, les animaux succomberont par la suite. Dans le même délai, au contraire, chez les cobayes traités, on voit de nombreux polynucléaires dans le liquide au point d'inoculaton où aucun œdème n'est visible ; quant aux mononucléaires, ils n'apparaissent que plus tard, après la disparition des bactéridies dont un certain nombre disparaît par mécanisme extra-cellulaire.

Nous avons voulu vérifier que le sérum de pigeon vacciné protège les animaux de même espèce. Nous nous sommes servi d'un échantillon spécialement exalté pour le pigeon, très virulent également pour le cobaye.

Deux pigeons ont reçu, le 3 avril 1900, des mélanges de sérum et de 1/4 de c. c. culture charbonneuse.

3 avril.	Pigeon tête blanche. 4 c. c. normal-sérum de pigeon. + 1/4 c. c. culture charbon.	Pigeon tête grise. 4 c. c. immun-sérum de pigeon, + 1/4 culture charbon.
8	Mort du charbon.	Survit indéfiniment.

III

IMMUNITÉ DU COBAYE

A. — Virulence des bactéridies injectées sous la peau des cobayes neufs et des cobayes vaccinés. — Nous avons employé la méthode qui consiste à injecter une certaine quantité de bactéridies sans spores simultanément sous la peau d'un cobaye neuf et d'un cobaye vacciné. Le lendemain, si on a employé des doses convenables, on peut recueillir une certaine quantité d'exsudat au moyen d'une pipette fine introduite à travers le pertuis créé la veille par l'aiguille.

Pour que l'expérience réussisse, la dose de bactéridies varie avec l'immunisation du cobaye. Nous trouvons une grande commodité à nous servir de cobayes moyennement immunisés, c'est-à-dire ayant bien supporté 1 ou 2 gouttes de culture

virulente, et à injecter à ces cobayes, en même temps qu'aux animaux neufs, 1/2 c. c. de culture de 24 heures de deuxième vaccin, exalté par 1 ou 2 passages.

Si, en effet, le cobaye vacciné est trop fortement immunisé ou si la dose de charbon injectée est trop faible, on ne pourra recueillir de bactéridies le lendemain. (C'est ce qui a entravé nos premiers essais.)

Nous avons déjà dit que l'œdème des cobayes vaccinés, inoculés par une dose voisine de la dose maxima qu'ils peuvent supporter, ne contient plus de bactéridies au bout de 40 à 48 heures; ce délai est abrégé pour les quantités plus faibles et pour les virus atténués. D'autre part, chaque fois que nous avons trouvé des bactéridies au point d'inoculation après 48 heures, le cobaye a succombé.

Dans l'expérience telle que nous l'avons réglée, on peut retirer au bout de 24 heures de l'œdème du cobaye neuf un liquide clair, riche en bactéridies libres, et ne contenant que très peu de leucocytes ; le cobaye vacciné fournit avec peine une petite quantité d'un liquide sanguinolent où les bactéridies sont rares, mais souvent libres, et qui renferme de très nombreux polynucléaires et peu ou pas de mononucléaires.

Ces liquides sont immédiatement dilués dans l'eau salée à 7 0/00, afin d'éviter la complication de les voir coaguler dans les pipettes. Les dilutions obtenues sont examinées au microscope dans le but d'établir une numération approximative, ensemencées pour acquérir la certitude que les bactéridies sont vivantes, et enfin injectées aux animaux réactifs en quantité inversement proportionnelle à leur richesse en bactéridies.

Nous verrons qu'il n'y a pas lieu de tenir compte de la petite quantité d'humeurs du vacciné introduite.

Après 3 expériences qui ont échoué pour les raisons données plus haut, nous avons obtenu les résultats suivants :

Expérience I. — Le 15 mai nous avons inoculé simultanément l'exsudat d'un cobaye.

15 mai.	Vacciné, inoculé la veille de 1/2 c. c. de 2e vaccin, deux passages, à une souris marquée de bleu.	Neuf, inoculé la veille de 1/2 c. c. de 2e vaccin deux passages, à une souris marquée de rouge.
16		Morte le 16 (25 ou 30 heures), du charbon.
17	Morte le 17 (36 à 42 heures), du charbon.	

Les doses étaient un peu fortes pour la souris.

Expérience II. — Le 13 juin.

Les bactéries, provenant d'un cobaye vacciné, inoculé la veille de vaccin II, 1 passage, sont injectées à		Les bactéridies provenant d'un cobaye neuf, inoculé la veille de vaccin II, 1 passage sont injectées à	
un cobaye marqué de bleu.	une souris marquée de bleu.	cobaye marqué de rouge.	une souris marquée de rouge.
	Meurt le 17 (a dévoré la souris rouge) du charbon.	Meurt le 15 au soir, du charbon.	Meurt le 15. Autopsie impossible.
Survit indéfiniment.			

La bactéridie, reprise dans l'œdème du cobaye vacciné, était vivante, puisqu'elle a tué la souris bleue.

Expérience III. — 1er juillet 1900.

Cobaye marqué de bleu, reçoit les bactéridies d'un cobaye vacciné.	Cobaye marqué de rouge, reçoit les bactéridies d'un cobaye neuf.
Survit indéfiniment.	Meurt le 3 juillet.

Les cobayes neufs auxquels les bactéridies étaient prises sont toujours morts en 2 ou 3 jours.

Les cobayes vaccinés différents ont été utilisés pour ces expériences. Il semble donc bien que la bactéridie se trouve atténuée dans l'organisme des cobayes vaccinés.

Cette atténuation paraît au premier abord considérable; mais il faut se rendre compte que la netteté des 3 expériences ci-dessus résulte d'un artifice et que le deuxième vaccin ayant subi un passage constitue le virus limite, pour ainsi dire, qui tue sûrement les cobayes à dose infime.

B. — Culture de la bactéridie dans le sérum de cobaye vacciné et dans le sérum de cobaye neuf. Les cultures de bactéridie (deuxième vaccin ayant subi 1 ou 2 passages) dans chacun de

ces sérums, ne présentent guère de différences après 24 heures à 36°, que les espaces clairs et la répartition en petits amas des filaments de l'immun-sérum, qui contiennent des spores au bout de 72 heures; dans le sérum normal, en revanche, nous avons remarqué quelques spores grosses qui donnaient à la bactéridie l'apparence d'un fuseau.

Les cultures de l'immun-sérum étaient au bout de 24 heures limpides avec un dépôt au fond du tube, tandis que celle du normal-sérum présentait un louche uniforme.

Ce résultat est contraire à ce qui est connu de l'agglutination qui est causée même par le sérum de cobaye normal. Le sérum spécifique agglutine davantage, en proportion très variable : en gouttes pendantes, on constate en un quart d'heure une agglutination au 1/500 quelquefois, et au moins à 1,200.

Pour apprécier la virulence des bactéridies cultivées dans le sérum normal et de celles du sérum spécifique de cobayes, nous les avons injectées à des cobayes.

Expérience I. — Culture du 9 mai 1899, injectée le 11, à des souris (premier vaccin).

11 mai.	Culture du sérum de cobaye vacciné. 4 gouttes.	Culture du sérum de cobaye normal. 4 gouttes.	4 gouttes culture en bouillon, + 4 gouttes sérum de cobaye vacciné.
	Souris marquée de bleu.	Souris marquée de rouge.	Souris marquée de bleu et rouge.
15 mai.	Morte du charbon.	Survit indéfiniment.	Morte du charbon.

Cette expérience date d'une époque où nous ne connaissions pas encore les propriétés du sérum de cobaye vacciné au point de vue de l'ummunité; les 4 gouttes de sérum de cobaye vacciné avaient pour but de compenser la quantité de sérum de cobaye vacciné données à la souris marquée de bleu.

Expérience II. — Avec du deuxième vaccin, 1 passage, en cultures dans le sérum, datant de 46 heures.

21 juillet.	Cobaye tête jaune, culture en normal-serum de cobaye. 495gr.	Cobaye tête noire, culture en normal sérum de cobaye. 500gr.
23	Meurt vers 4 heures, du charbon.	Survit jusqu'au 25.

Expérience III. — Avec les mêmes cultures abandonnées à la température ordinaire, nous injectons 2 nouveaux cobayes le 26 juillet, en même temps que 2 souris. Les deux souris survivent indéfiniment; les 2 cobayes meurent à 15 heures d'inter

valle l'un de l'autre, celui qui a reçu les bactéridies de l'immun-sérum le premier, du 31 juillet au 1er août.

Peut-être pourrait-on admettre que les substances atténuantes du sérum spécifique ont été détruites dans l'intervalle du 21 ou 26 juillet, ce qui correspondrait à ce fait que les vieilles cultures dans l'un et l'autre sérum ne présentent plus de différences morphologiques, et que les bacilles s'y montrent bien colorés, mais un peu gonflés, comme boursouflés par places.

Une quatrième expérience avec cultures de 3 jours nous a donné un résultat analogue à celui de l'*Expérience II*.

En somme, peut-être y a-t-il chez certains cobayes vaccinés des substances atténuantes dans le sérum, mais l'effet en serait bien fugace ; nos expériences ne permettent pas de conclure que les bactéridies cultivées dans l'immun-sérum subissent d'atténuation.

C. — Sérum des cobayes vaccinés. Nous avons tenté sans succès la sérothérapie des cobayes et des souris au moyen du sérum de cobayes vaccinés; nous avons essayé d'empêcher ou de retarder l'infection causée par les vaccins au moyen de sérum pris à des cobayes vaccinés contre la bactéridie virulente, sans y réussir davantage.

Expérience I. — 9 mai 1899.

Souris blanche, charbon seulement.	Souris blanche marquée de jaune, charbon. + 0cc,8 sérum de cobaye vacciné (injectés loin l'un de l'autre).

Mortes toutes les deux le 11 au matin, du charbon.

Expérience II. — 27 avril 1899. Deux souris tache rouge pour le sérum et le deuxième vaccin, 2 souris marquées de bleu comme témoins. L'une des bleues meurt la première de la série, l'autre bleue en revanche survit aux autres.

Expérience III. — Nouvel essai le 3 mai avec deux souris. Celle qui reçoit, outre la bactéridie virulente, 13 gouttes de sérum de cobaye vacciné meurt la première. Autopsie montrant les bactéridies dans le sang.

Expérience IV. — Essai pratiqué le 28 juillet 1899, sur une série de 5 cobayes dont chacun avait reçu une forte dose de bactéridies. L'un des cobayes avait reçu en outre 2 c. c. de sérum de cobaye normal, un autre, 2 c. c. de sérum de cobaye vacciné, un troisième, 2 c. c. de sérum ce pigeon normal; le

dernier, 2 c. c. de sérum de pigeon vacciné. La dose de sérum était un peu faible, la quantité de bactéridies considérable. Le cobaye qui avait reçu le sérum de cobaye vacciné survécut de 1 jour à tous les autres, qui moururent pêle-mêle en 40 ou 45 heures; résultat en contradiction avec toutes les autres expériences. (C'est l'essai dont il est parlé d'autre part (voir *Expérience IV*) avec le sérum de pigeon.)

Expérience V. — Sur des cobayes, avec 1 goutte de deuxième vaccin ayant subi 1 passage, 4 juin 1900. 4 c. c. de sérum spécifique n'empêchent pas le cobaye traité de mourir avec l'autre dans la journée du 6.

Expérience VI. — Le 2 août 1899, avec le même sérum de cobaye qui avait semblé protéger le cobaye de l'expérience IV, nous injectons une souris, tandis qu'un témoin reçoit du sérum de normal. La dose considérable de 1 c. c. de sérum n'empêche pas que, dans la journée du 5, les deux souris ne meurent : le 6 au matin, je constate que la souris à l'immun-sérum a été dévorée par l'autre.

En somme, nous pouvons affirmer que le sérum de cobaye solidement vacciné contre le charbon ne jouit d'aucune propriété immunisante, non seulement à l'égard de la bactéridie virulente, mais encore à l'égard de l'un des virus atténués ayant servi à l'immunisation.

Conclusions. I. On peut vacciner facilement contre le charbon le pigeon et difficilement le cobaye par la méthode des vaccins charbonneux.

II. *A.* — Les bactéridies introduites sous la peau des pigeons vaccinés conservent leur virulence.

B. — La virulence de la bactéridie cultivée en immun-sérum de pigeon diminue.

C. — Le sérum de pigeon vacciné protège bien les cobayes et les souris contre la mort par le charbon.

III. *A.* — Les bactéridies introduites sous la peau des cobayes vaccinés s'y atténuent.

B. — Cultivées dans le sérum de cobaye vacciné, elles semblent y conserver leur virulence.

C. — Le sérum de cobaye fortement vacciné est sans action sur l'infection des souris et des cobayes inoculés de charbon.

Les Antihémolysines naturelles

Par le Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Les lecteurs de ces *Annales* sont suffisamment familiarisés avec le terme *cytotoxine*, introduit dans la science par M. Metchnikoff, pour que nous nous dispensions d'entrer dans de longs détails sur ce point. Ce sont des toxines cellulaires, incorporées dans les sérums des animaux ayant reçu en injection des cellules d'une espèce animale étrangère.

La nature chimique de ces toxines est très peu connue. Ce qui les caractérise avant tout, c'est leur spécificité qui porte non seulement sur la nature de la cellule, mais encore sur l'espèce animale à laquelle cette cellule appartient.

Ainsi, par exemple, une cytotoxine active pour les globules rouges de lapin est sans action non seulement sur les cellules rénales ou hépatiques, mais elle est aussi inactive vis-à-vis des globules rouges autres que ceux de lapin. En d'autres termes, à chaque groupe cellulaire d'une espèce animale donnée correspond une cytotoxine spéciale ou spécifique.

Cette cytotoxine, dirigée contre une catégorie déterminée de cellules, est-elle unique dans la nature, ou bien en existe-t-il un certain nombre, et cela selon l'espèce animale qui est chargée d'en fabriquer?

Prenons un exemple concret pour mieux fixer les idées. Nous savons qu'en injectant à un cobaye des globules rouges de mouton, on obtient une hémotoxine qui dissout les globules rouges de mouton; on peut obtenir également une hémotoxine active pour le mouton, en injectant du sang défibriné de ce dernier à un autre animal, à un lapin, par exemple. Or, on peut se demander si ces deux hémotoxines, actives pour la même espèce de globules, mais fournies par deux espèces animales différentes, ne font qu'un, ou bien si ce sont deux substances différentes.

Ce problème, à notre connaissance, n'a pas été étudié. *A priori*, tout porte à croire qu'il s'agit de la même toxine, les propriétés de celle-ci devant être régies, à l'exemple des sérums anti-microbiens, par la nature des cellules injectées et non pas par celle de l'animal que l'on injecte. Des expériences qui vont être résumées plus loin, il résulte en effet que les cytotoxines en question, provenant de différents animaux, sont identiques pour ce qui concerne leur partie essentielle, l'anticorps spécifique que nous appelons avec M. Metchnikoff, *substance fixatrice* ou *fixateur*, que M. Bordet appelle *substance sensibilisatrice*, et que MM. Ehrlich et Morgenroth désignent sous les noms de *Immunkörper*, *Zwischenkörper*, *Amboceptor*, etc.

La différence qui existe entre semblables cytotoxines provenant des espèces animales différentes, ne porte que sur la *cytase* (*alexine*) qui varie avec chaque animal.

En résumé, à chaque groupe cellulaire correspond dans la nature un seul anticorps, un seul fixateur, quel que soit l'animal qui le fabrique. La spécificité qui relie une cellule à son fixateur est aussi rigoureuse que celle qui existe entre le fixateur et l'antifixateur. Ces trois éléments, cellules, fixateur et antifixateur, sont si intimement liés entre eux qu'en constatant, au cours de notre étude, un antifixateur dans un sérum, il nous sera facile de remonter à son origine et d'en retrouver les stades intermédiaires [1].

*
* *

Le présent mémoire a pour but de démontrer que tout sérum renferme à l'état normal des anticytotoxines que nous considérons, en raison des faits exposés plus bas, comme des anti-autocytotoxines.

1. Nos expériences étaient complètement terminées, quand nous avons eu connaissance d'un grand mémoire publié tout récemment par MM. Ehrlich et Morgenroth (*Berliner Klinische Wochenschrift*, 1901, nos 21, 22). Les auteurs concluent à la multiplicité des substances fixatrices et antifixatrices, pour la même catégorie des cellules. Nous regrettons, étant donnée la complexité de plus en plus grande de la question, de ne pas pouvoir suivre ici, les auteurs dans leurs argumentations. Nous ferons seulement remarquer que malgré les nouvelles conceptions, très ingénieuses, des savants allemands, il nous est impossible d'interpréter nos expériences autrement que dans un sens tout à fait opposé aux idées soutenues par eux.

Voici les considérations qui nous ont engagé à chercher ces substances dans des sérums normaux, réputés jusqu'ici comme tout à fait indifférents vis-à-vis de leurs propres cellules.

La vie d'un animal peut être envisagée comme une suite ininterrompue de destructions des cellules, se remplaçant continuellement par de nouvelles générations de cellules jeunes. Nous nous sommes demandé ce que deviennent les cellules usées, incapables de servir l'organisme. On connaît le sort de ces cellules au point de vue morphologique; elles deviennent généralement la proie de gros mononucléaires qui les englobent et les digèrent à leur intérieur. Même dans les organes dits nobles, comme le cerveau, les cellules affaiblies n'échappent pas aux phagocytes; ainsi, sur les coupes de cerveau des chiens normaux, on voit des cellules nerveuses entourées de leucocytes qui s'apprêtent à les digérer. Il en est de même pour le foie, le rein et les autres organes.

Pour ce qui concerne les globules rouges, leur destruction à l'intérieur des macrophages de la rate est un fait trop connu pour que nous soyons obligé d'y insister.

En présence de ces faits, nous nous sommes demandé si cette digestion des cellules par les propres phagocytes de l'animal ne saurait entraîner des conséquences fâcheuses pour les autres cellules du même animal. Etant donné que cette digestion intracellulaire des cellules par les phagocytes rappelle de tous points le mécanisme de la fabrication des cytotoxines en général, il y a lieu de se demander si, lors de cette autophagocytose physiologique que nous subissons d'une façon continue, nous ne fabriquons pas nous-mêmes des poisons pour nos propres cellules, soit, des auto-cytotoxines.

Il était inutile, bien entendu, de chercher dans le sérum ces autocytotoxines, car l'expérience de tous les jours nous montre que les cellules, les globules rouges, par exemple, loin de se dissoudre rapidement dans leur propre sérum, s'y conservent, au contraire, admirablement bien dans l'immense majorité des cas[1]. Mais si l'on ne peut pas constater dans un sérum normal la présence des auto-cytotoxines, cela ne veut pas encore dire

1. Faisons rappeler à ce propos que M. Metalnikoff a réussi à obtenir, dans le laboratoire de M. Metchnikoff, une autospermotoxine réelle ; c'est la seule autocytotoxine qui soit connue jusqu'à présent.

qu'elles n'y sont pas; car l'organisme étant personnellement menacé par leur présence s'empresse peut-être de neutraliser leur effet en leur opposant des anticorps spécifiques, qui dans le cas présent seraient des *anti-autocytotoxines*. Guidé par ces considérations, nous nous sommes mis à chercher ces dernières dans les sérums normaux.

Afin de mettre en évidence les propriétés antitoxiques d'un sérum, il faut avoir tout d'abord la cytotoxine correspondante; par la raison que nous venons d'indiquer, il nous fut impossible de l'isoler du sérum du même animal; il a donc fallu s'adresser à une cytotoxine obtenue dans les mêmes conditions par un animal étranger, lequel, n'étant pas sensible, ne cherche pas à fabriquer en même temps une anticytotoxine.

Cette cytotoxine, fournie par l'animal étranger, est-elle identique à l'auto-cytotoxine fabriquée par l'animal sensible? A ceci nous pouvons répondre que, abstraction faite de la cytase, variant d'une espèce à l'autre, il n'y a aucune raison de croire que l'auto-cytotoxine, ou pour être plus précis, l'auto-fixateur des hématies humaines, par exemple, soit différent d'un fixateur de ces mêmes globules, si celui-ci provient d'une espèce étrangère, d'un lapin, d'un cobaye, ou d'une chèvre. Par une série d'expériences entreprises dans cet ordre d'idées, nous avons pu nous assurer que les fixateurs, actifs pour une certaine catégorie de cellules, mais fabriqués par des espèces animales différentes, sont identiques en ce sens qu'ils sont spécifiquement neutralisés par un seul et même antifixateur.

Nous ferons remarquer une fois pour toutes que bien que les considérations formulées plus haut s'appliquent à toutes les cytolysines, nos expériences ont porté exclusivement sur les hémolysines, celles qu'il est le plus facile de mettre en évidence.

Il va sans dire qui si notre théorie de l'auto-intoxication cellulaire est vraie, elle doit se justifier dans tous les cas où il y a auto-destruction des cellules, c'est-à-dire, elle doit s'appliquer à tous les êtres vivants. Il faut donc que toutes les espèces animales renferment des anticytolysines, soit des antihémolysines dans le cas particulier, avec toutes leurs propriétés et les caractères de spécificité que nous leur connaissons.

Étant donnée la complexité de ces recherches, nous avons

dû les limiter à un certain nombre d'animaux de laboratoire (lapin, cobaye, oie, poule, mouton [1]) et à l'homme.

Les résultats des recherches furent positifs dans tous les cas sans exception, ce qui nous autorise à conclure, avec un certain degré de probabilité, que la réaction anti-hémolytique de l'organisme est une réaction générale, en vertu de laquelle l'organisme lutte continuellement contre la destruction de ses propres hématies.

II

La recherche du pouvoir anti-hémolytique dans les sérums d'animaux normaux était réalisée d'après le principe que M. Bordet appliqua le premier au sérum d'animaux, vaccinés contre leur hémolysine spécifique.

Afin de ne pas tomber dans des redites inutiles, je ne rapporterai pas ici les nombreuses expériences faites avec chaque espèce animale, celles-ci étant toutes faites sur le même plan ; il suffira d'en décrire une avec détails pour se faire une idée nette du phénomène en général.

Parmi les différents sérums d'animaux que nous avons étudiés (cobaye, lapin, oie, poule, mouton), nous choisirons comme exemple celui du mouton ; les résultats obtenus avec ce sérum seront rapportés plus bas. Nous voudrions nous arrêter d'abord sur le sérum humain, que nous avons étudié avec une prédilection toute naturelle.

Les sérums humains que nous avons examinés provenaient tous, sauf un échantillon qui était du sérum normal, de malades d'âge et de sexe différents (épilepsie, 8, — cancer du sein, 4, — fièvre typhoïde, 3, — urémie, 2, — pneumonie, 1, — congestion pulmonaire, 1, — diabète, 1, — néphrite, 1, — purpura, 1, — syphilis, 1, — sérum normal de l'auteur [2]).

1. Nous avons examiné aussi sous ce rapport les sérums de chien, de cheval et de bœuf; mais, en raison de la fragilité de leurs globules, il fut impossible de vérifier sur ces animaux la présence d'antihémolysines ; nous reviendrons sur ce sujet avec plus de détails dans la partie expérimentale. (Chap. II.)

2. Les sérums m'ont été très obligeamment fournis par MM. Widal et Vaquez, auxquels j'exprime ici ma profonde reconnaissance ; je prie également mes amis MM. Jean Charcot et R. Petit, qui m'ont procuré plusieurs échantillons de sérum humain, d'accepter l'assurance de ma sincère et affectueuse gratitude.

Pour avoir de l'hémolysine vis-à-vis des globules rouges de l'homme, nous nous sommes adressé à du sérum de chèvre, immunisée avec du sang défibriné de l'homme. Nous employons ce sérum tantôt *tout entier*, lorsqu'il était frais, c'est-à-dire avec la cytase de la chèvre, tantôt nous le chauffions à 55° pour avoir seulement le fixateur (la sensibilisatrice), que l'on réactivait ensuite dans certains cas avec de la cytase de cobaye, dans d'autres cas avec celle de lapin ou bien avec celle de l'homme.

Quant aux globules rouges, nous nous sommes adressé souvent aux globules du même individu dont provenait le sérum; d'autres fois nous avions recours à nos propres globules; dans un cas comme dans l'autre, les globules étaient lavés 2-3 fois à l'eau physiologique à 7,5 0/00.

Voilà donc les trois éléments nécessaires pour l'expérience : sérum humain, hémolysine humaine et globules humains.

On prépare d'abord le mélange de sérum hémolytique avec du sérum humain, puis, après environ trois heures de contact, on ajoute des globules rouges émulsionnés dans de l'eau physiologique à 7,5 0/00.

En même temps, on dispose une série de tubes-témoins; dans ceux-ci, on met la même quantité d'hémolysine que plus haut, mais au lieu de sérum humain, on ajoute des doses égales de sérum de différents animaux (lapin, cobaye, mouton, poule, bœuf, cheval, bouc, chien), puis, après en contact de même durée, on ajoute des globules rouges, comme plus haut.

Afin d'éliminer l'action possible de la cytase des sérums humains et d'animaux, dans lesquels on cherchait l'action antihémolytique, on les chauffait tous préalablement à 56° pendant une demi-heure.

Or, voici ce que l'on a constaté déjà au bout de 2-3 heures de séjour à l'étuve, ou après 12-15 heures à la température de la chambre (15°) : alors que dans tous les tubes-témoins renfermant des sérums d'animaux, on observe une diffusion notable de l'hémoglobine, ou même une dissolution complète des globules, dans des tubes contenant du sérum humain, on ne constate pas la moindre trace de dissolution, ou une diffusion d'hémoglobine extrêmement faible; d'où nous concluons que le sérum humain paralyse l'action dissolvante de l'hémolysine humaine vis-à-vis des globules humains.

Voici une de nos nombreuses expériences de ce genre :

On prépare l'hémolysine en mélangeant 1 partie de sérum frais de cobaye (cytase) avec 2 parties de sérum de chèvre immunisée contre le sang humain; ce sérum de chèvre est préalablement chauffé à 55°-56° pendant une demi-heure (fixateur). On met dans une série de petits tubes deux gouttes de ce mélange, puis on ajoute quinze gouttes de divers sérums qui vont être indiqués plus bas. Après plusieurs heures (3 heures) de contact, on ajoute une ou deux gouttes d'une émulsion très étendue de globules rouges de l'homme dans l'eau physiologique à 0,75 0/0.

L'expérience a été faite à 7 heures du soir; les tubes sont restés à la température de la chambre toute la nuit; le lendemain matin on constate les résultats suivants :

1) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes d'eau physiologique à 7,5 0/00.	Le liquide est rouge. Au fond du tube il reste encore un peu de globules intacts; la majeure partie est dissoute.
2) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de lapin chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution des globules est moins avancée, il en reste encore un tiers de globules environ non dissous.
3) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de mouton, chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution des globules est aussi prononcée que dans le tube n° 2.
4) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de cheval, chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution des globules est aussi prononcée que dans le tube n° 2.
5) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de bœuf, chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution des globules est presque complète.
6) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de chien, chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution des globules est très prononcée, mais semble l'être un peu moins que dans le tube n° 2.
2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de cobaye, chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution des globules est aussi prononcée que dans le tube n° 2.
8) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum de bouc, chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution est plus avancée que dans le tube n° 2; elle est presque complète.
9) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum humain n° 1 (pneumonie), chauffé à 55° (1/2 h.).	La dissolution est nulle; le sérum est aussi clair que dans le tube témoin ne renfermant pas d'hémolysine.
10) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum humain n° 2 (congestion pulmonaire), chauffé à 55° (1/2 h).	La dissolution est nulle, comme dans le tube n° 9.

11) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum humain n° 3 (épilepsie), chauffé à 55° (1/2 h.).	On constate une diffusion d'hémoglobine extrêmement légère.
12) 2 gouttes de mélange hémolytique, 15 gouttes de sérum humain n° 4 (cancer) chauffé à 55° (1/2 h.).	La diffusion de l'hémoglobine est nulle, comme dans le tube n° 9.

Nous répétons que cette expérience a été refaite avec chaque nouvel échantillon de sérum humain que nous avons pu nous procurer, et toujours avec le même résultat : l'action antihémolytique du sérum humain, par comparaison avec des sérums d'origine animale, a été manifeste dans tous les cas (24 cas) sans exception; certes, on pourrait noter des différences, en comparant entre eux des sérums humains de diverses provenances, mais toujours le sérum humain, même le moins antihémolytique, protégeait notablement mieux les globules humains que n'importe quel sérum animal, essayé dans les mêmes conditions.

*
* *

Chaque hémolysine préparée se compose, comme nous le savons, des deux substances : cytase (alexine) et fixateur (sensibilisatrice). Il suffirait que, dans notre expérience, un de ces éléments fût neutralisé par le sérum humain, pour que l'effet hémolytique se trouvât supprimé.

On devait donc se demander si, dans l'expérience citée plus haut, l'hémolysine n'est pas paralysée simplement parce que la cytase de cette dernière rencontre dans le sérum humain une anticytase correspondante, supposition qui, *a priori*, n'a rien d'invraisemblable.

Il a fallu donc chercher par des expériences appropriées les propriétés anticytasiques du sérum humain vis-à-vis des différentes cytases, puis choisir, pour réactiver le sérum fixateur, une ou des cytases vis-à-vis desquelles le sérum humain est sans action. Il est inutile d'allonger ce travail par l'exposé de toutes les expériences réalisées à cet effet ; qu'il nous suffise de dire que le sérum humain possède en effet déjà naturellement un pouvoir de neutraliser à un certain degré la cytase de la chèvre [1],

1. Au cours de nos études sur les anticytases naturelles, nous avons constaté que 25 gouttes de sérum humain empêchent 1 goutte de sérum frais de chèvre de dissoudre les globules de cobaye, alors que cette dissolution n'est pas empêchée par les sérums de cheval, de bœuf, de poule, ajoutés dans les mêmes proportions.

de sorte que, en se servant du sérum hémolytique non chauffé de chèvre, comme nous l'avons fait souvent au début de nos expériences, il y avait lieu de se demander s'il faut attribuer le pouvoir antihémolytique du sérum humain à sa propriété anticytasique ou bien à sa propriété antifixatrice.

Le doute est levé dès qu'on remplace la cytase de chèvre par celle de cobaye, de lapin, ou même par la cytase de l'homme.

En ajoutant au sérum fixateur chacune de ces cytases indiquées, vis-à-vis desquelles le sérum humain est sans action, ce dont nous avons eu soin de nous assurer par des expériences à part, on acquiert la certitude que dans l'expérience ci-dessus il s'agit véritablement d'une action purement antifixatrice et non anticytasique.

En déclarant qu'il s'agit là certainement d'une action antifixatrice, nous nous avançons pour l'instant, peut-être, au delà de ce que comporte l'expérience citée plus haut, qui ne juge directement que la question de l'anticytase. Il faut démontrer, en effet, que dans le sérum humain nous avons affaire à une véritable substance antifixatrice, et que celle-ci répond à tous les caractères connus des antifixateurs artificiels. Il faut donc démontrer qu'elle se comporte d'une façon déterminée vis-à-vis des températures élevées; puis, il faut qu'elle soit, et cela est un caractère de première importance, strictement spécifique.

Pour ce qui concerne l'influence des températures élevées, l'expérience est très facile à réaliser.

Nous savons déjà que ce pouvoir antihémolytique résiste bien au chauffage à 55°-56° pendant une demi-heure, puisque toutes nos expériences sont faites précisément avec des sérums chauffés (56°-55°).

Mais si on porte à 65°-68°, la température du bain-marie dans lequelon chauffe le sérum, et si on prolonge le chauffage pendant une ou deux heures, on ne tarde pas à s'apercevoir que le sérum humain perd complètement ou en grande partie son pouvoir de neutraliser l'hémolysine.

Lorsqu'on reprend l'expérience citée plus haut et que l'on mélange dans une série de tubes de l'hémolysine avec des sérums humains chauffés à 55°-56°; dans une autre série de tubes avec les mêmes sérums chauffés à 67°; et enfin, dans une troisième série, avec des sérums de divers animaux,

chauffés à 55° 56°, et que l'on ajoute ensuite (après plusieurs heures de contact) dans tous les tubes des globules humains, on constate ceci : dans tous les tubes de la première série le sérum reste aussi clair que dans des tubes témoins, qui ne contiennent pas d'hémolysine; par contre, dans les tubes de la deuxième et de la troisième série, il y a une diffusion très accentuée de l'hémoglobine ou même dissolution complète, et cela est aussi prononcé dans les uns que dans les autres.

En d'autres termes, le sérum humain chauffé à 67°-68° pendant une ou deux heures, se comporte vis-à-vis de l'hémolysine humaine comme n'importe quel sérum animal chauffé à 55°-56°, c'est-à-dire il n'est plus du tout antihémolytique.

Avant de passer à l'autre caractère qui est la spécificité, nous voudrions rapporter en abrégé une de nos expériences portant sur des sérums humains chauffés à des températures différentes.

On prépare l'hémolysine en faisant un mélange de parties égales de sérum chauffé de chèvre vacciné (fixateur) et de sérum frais de cobaye (cytase). On prélève de ce mélange 2 gouttes pour chaque tube, on ajoute 15 gouttes de différents sérums dont on cherche le pouvoir antihémolytique ; puis, après plusieurs heures de contact, on met des globules humains émulsionnés dans de l'eau physiologique à 0,75 0/0.

1) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes d'eau physiologique à 7 0/00.	Dissolution complète.
2) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de sérum de lapin, chauffé à 55°.	Dissolution presque complète; il reste au fond du tube quelques globules intacts.
3) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de sérum humain (congestion pulmonaire), chauffé à 55°.	Diffusion d'hémoglobine extrêmement légère ; le sérum est à peine teinté en rose.
4) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes du même sérum que dans le tube n° 3, mais chauffé à 67°.	Dissolution presque complète des globules, comme dans le tube n° 2.
5) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de liquide de vésicatoire (cancer), chauffé à 55°.	Dissolution nulle.
6) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de même liquide chauffé à 7° 6.	Dissolution complète.
7) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de sérum humain (diabète), chauffé à 55°.	Diffusion d'hémoglobine presque imperceptible.

8) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de même sérum (diabète), chauffé à 68°.	Dissolution complète.
9) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de sérum humain n° 6 (épilepsie).	Le sérum a pris une teinte rose très légère; les globules sont intacts.
10) 2 gouttes d'hémolysine, 15 gouttes de même sérum, chauffé à 67°-68°.	Dissolution complète.

Il ressort donc de cette expérience qu'un sérum humain, chauffé à 67°-68° pendant une ou deux heures, n'est pas plus antihémolytique qu'un sérum animal, alors que ce même sérum humain chauffé à 55°-56° possède un pouvoir antihémolytique très manifeste.

*
* *

Passons maintenant au deuxième caractère des antihémolysines, qui est la spécificité.

Si le sérum humain chauffé à 55° protège les globules humains contre la dissolution par l'hémolysine parce qu'il renferme réellement une antihémolysine, il est nécessaire que cette protection soit très spécifique; en d'autres termes, il faut que cette protection ne puisse pas s'étendre à d'autres globules que ceux de l'homme: puis il faut que cette protection soit surtout efficace en présence de l'hémolysine spécifique.

Rien n'est plus facile que de démontrer que le pouvoir protecteur du sérum humain est bien limité aux globules humains.

En cherchant dans les sérums normaux de divers animaux de laboratoire la propriété antihémolytique vis-à-vis de leurs globules respectifs, nous avons eu besoin de sérums étrangers pouvant nous servir de témoins; or, il nous est arrivé quelquefois d'employer à cet effet, entre autres sérums, aussi celui de l'homme, et toujours dans ces cas le sérum humain se montrait notablement moins protecteur vis-à-vis des globules étrangers que le sérum de l'animal auquel appartenaient ces globules.

Ainsi, par exemple, lorsqu'on mélange une hémolysine dirigée contre les globules de mouton avec du sérum humain, et que l'on ajoute ensuite des globules rouges de mouton, on constate que la dissolution de ces derniers n'est nullement empêchée par du sérum humain, alors que l'effet hémolytique est nul ou

peut s'en faut, dans les tubes où, au lieu de sérum humain, il a été ajouté la même quantité de sérum de mouton.

Et les exemples du même genre peuvent être multipliés à volonté.

Il s'ensuit donc que le sérum humain possède un pouvoir protecteur très restreint, et, autant que nos expériences permettent d'en juger, ce pouvoir s'exerce spécifiquement vis-à-vis des globules de l'homme.

Cette action protectrice spécifique du sérum vis-à-vis de ses propres globules, nous l'avons constatée également chez le cobaye, le lapin, le mouton, la poule et l'oie.

Avons-nous affaire ici à une action semblable à celle que nous connaissons pour les glycosides, ou est-ce un phénomène d'un ordre différent?

Pour ce qui concerne les glycosides (saponine, solanine, etc.), nous savons qu'en milieu salé ils jouissent d'un pouvoir hémolytique des plus marqués, et que ce pouvoir est notablement paralysé en présence d'un sérum sanguin. Si, par exemple, une dose déterminée de saponine est capable de dissoudre 1 c. c. de globules rouges émulsionnés dans de l'eau physiologique, il faut 10 ou 15 doses de saponine pour arriver à dissoudre la même quantité de globules rouges, lorsque ceux-ci sont additionnés d'un sérum sanguin. M. Hédon[1] a vu, et nous pouvons confirmer ses observations, que certains sérums protègent les globules contre une dose 20-25 fois hémolytique d'un glycoside.

D'après ce savant, « si les globules résistent dans le sérum à des doses de glycosides bien supérieures aux doses toxiques dans l'eau salée, cela tient à ce que les matières albuminoïdes du sérum sont un obstacle à l'hémolyse. »

Cette action protectrice du sérum vis-à-vis des glycosides est-elle comparable à l'action protectrice que nous constatons dans nos expériences?

Sans la moindre hésitation, nous répondons : non.

Tout en étant ressemblants au premier abord, ces deux sortes de phénomènes présentent deux caractères essentiellement différents :

1. E. Hédon, Sur l'hémolyse par les glycosides globulicides, et les conditions de milieu qui la favorisent ou l'empêchent, *Archives Internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 1901, vol. VIII, p. 381.

1° Bien que le pouvoir protecteur de différents sérums ne soit pas le même, comme c'est le cas dans nos expériences, M. Hédon a vu que « les globules d'une espèce déterminée ne sont pas mieux protégés par leur propre sérum, mais bien par des sérums étrangers et surtout par des sérums appartenant à des espèces très éloignées » ;

2° M. Hédon a vu également « que le chauffage du sérum à 60°-65° C., pendant plusieurs heures et à plusieurs reprises, ne lui enlève absolument rien de ses qualités protectrices, et même il paraît y gagner légèrement ».

Il est donc clair que, bien que la protection du sérum contre les glycosides et contre les hémolysines soit d'apparence du même ordre, en réalité le mécanisme en est profondément différent.

*
* *

Nous avons fait remarquer plus haut que l'on aura démontré la nature antihémolytique vraie de la substance protectrice du sérum humain quand il sera constaté que cette action protectrice ne s'étend pas à d'autres globules que ceux de l'homme, e puis que cette protection est efficace principalement en présence de l'hémolysine spécifique.

La première moitié de cette démonstration étant déjà faite, il nous reste à nous occuper de la seconde.

Certes, si les globules humains, mis en présence de l'hémolysine et du sérum humain, ne laissent pas diffuser leur hémoglobine simplement parce qu'ils sont protégés par ce sérum, cette action protectrice doit se manifester toujours, quelle que soit la nature de la substance hémolysante : si, par contre, le sérum humain empêche la dissolution des globules parce qu'il neutralise spécifiquement l'hémolysine, il est clair que cette neutralisation n'aura pas lieu avec un corps dissolvant, envers lequel le sérum humain n'exerce pas un pouvoir antitoxique.

Pour savoir laquelle de ces deux hypothèses est la vraie, nous nous sommes adressé à des sérums qui dissolvent naturellement les globules rouges de l'homme. Ce choix nous a été dicté par cette considération que ces sérums naturellement hémolysants étant de par leur nature chimique beaucoup plus voisins des sérums spécifiquement hémolytiques que des glyco-

sides par exemple, on pourrait mieux apprécier la différence, si toutefois elle existait.

Nous arrêtâmes notre choix sur le sérum de bœuf et sur celui de lapin; employés le jour de la saignée, tous les deux se montrent très hémolytiques vis-à-vis des globules humains.

L'expérience a été disposée identiquement de la même façon que celle rapportée à la page 79, avec cette différence qu'au lieu de l'hémolysine spécifique, nous avons employé l'hémolysine naturelle du sérum de bœuf ou de lapin. Si au cours de ces expériences on avait constaté dans différents tubes le même degré de diffusion d'hémoglobine ou de dissolution que dans l'expérience de la page 79, si en plus on avait remarqué que dans les tubes contenant du sérum humain la diffusion de l'hémoglobine est nulle, alors la conclusion aurait été évidente : nous aurions déclaré qu'il s'agit dans ces deux expériences incontestablement d'une action protectrice ou conservatrice, inhérente au sérum humain, et non d'une action antihémolytique, dirigée spécifiquement contre l'hémolysine.

Or, en réalité les choses se passent tout autrement; voici une expérience, dans laquelle du sérum frais de lapin nous servait de substance hémolytique.

Dans une série de tubes, on fait un mélange de 3 gouttes de sérum frais de lapin et de 15 gouttes de différents sérums, chauffés à 56°. Puis, après 3 heures de contact, on ajoute des globules rouges de l'homme dans de l'eau physiologique à 7,5 0/00.

1) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes d'eau physiologique à 7,5 0/00.	Dissolution très avancée, mais incomplète; il reste au fond du tube une moitié de globules intacts (1/2).
2) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum de mouton, chauffé à 55°.	Dissolution aussi prononcée que dans le tube précédent (n° 1).
3) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum de chien, chauffé à 55°.	Dissolution prononcée, mais un peu moins que dans le tube n° 1; il reste environ 2/3 de globules intacts.
4) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum de bouc chauffé à 55°.	Dissolution presque complète.
5) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum de lapin, chauffé à 55°.	Dissolution nulle.

6) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum de bœuf, chauffé à 55°-56°.	Dissolution nulle.
7) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55° (épilepsie n° 6).	Dissolution nulle.
8) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55° (épilepsie n° 4).	Dissolution nulle.
9) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55° (épilepsie n° 3).	Dissolution aussi intense que dans le tube n° 1.
10) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 58° (épilepsie n° 7).	Dissolution aussi intense que dans le tube n° 1.
11) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes de sérum humain, chauffé à 55°-56° (épilepsie n° 1).	Dissolution aussi intense que dans le tube n° 1.
12) 3 gouttes de sérum de lapin, 15 gouttes du même sérum humain que dans le tube n° 11, mais chauffé à 67°.	Dissolution notablement moins prononcée que dans le tube précédent (n° 1).

Nous voyons donc que, dès qu'on vient à remplacer l'hémolysine humaine spécifique par une hémolysine non spécifique, par du sérum de lapin, par exemple, les résultats changent du tout au tout. Certes, dans les tubes n°s 7 et 8, nous voyons que le sérum humain protège les globules humains; mais, à côté de cela, nous constatons que dans les tubes n°s 9, 10, 11, le sérum humain, provenant de trois malades différents, est incapable de neutraliser l'action hémolytique du sérum de lapin sur les globules humains, alors que dans les tubes n°s 5 et 6 cette action hémolysante est neutralisée complètement par le sérum de lapin et de bœuf; puis, chose curieuse, en comparant les tubes n°s 11 et 12, nous remarquons que le sérum humain (épileptique n° 1) protège notablement mieux les globules rouges lorsqu'il est chauffé à 67° que lorsqu'il est chauffé à 55°-56°.

La conclusion est claire : le sérum humain n'agit pas sur les globules de sang en tant que bon milieu conservateur; il protège bien ses globules, mais uniquement contre l'action dissolvante de l'hémolysine spécifique; dès qu'on emploie un autre

dissolvant, si proche qu'il soit de par sa nature du sérum hémolytique, on n'observe pas plus d'action protectrice par du sérum humain que par n'importe quel autre sérum animal.

Tels sont les faits; pour les traduire en langage de cytolysine, nous ne voyons qu'une seule formule qui est celle-ci : le sérum humain possède un pouvoir antihémolytique vis-à-vis de l'hémolysine humaine, et ce pouvoir est aussi strictement spécifique que celui des antihémolysines artificiellement préparées. Si nous nous servons des termes — hémolytique et antihémolytique — c'est uniquement dans l'intérêt de la clarté; en réalité, c'est du pouvoir fixateur et antifixateur qu'il s'agit.

Pour finir ce chapitre sur le sérum humain, nous voudrions noter un petit fait qui mérite d'être signalé.

Au cours de ce travail, nous avons eu souvent l'occasion de doser le pouvoir antihémolytique du sérum humain, ainsi que de tous les autres sérums étudiés sous ce rapport. Or, chose curieuse, la proportion entre les sérums neufs devant être employés et la quantité de fixateur à neutraliser a été dans la grande majorité des cas, et chez tous les animaux, à peu près la même que celle que M. Bordet a trouvée pour le pouvoir antifixateur de ses sérums artificiellement préparés (15 : 1 ou 20 : 1).

Pour le moment, nous nous contentons de signaler cette coïncidence sans en tirer aucune conclusion.

*
* *

La présence de l'antihémolysine dans du sérum humain a d'autant plus d'intérêt que ce n'est pas un fait isolé. Quand on s'adresse aux sérums de lapin, de cobaye [1], d'oie, de poule, de mouton, on constate invariablement le même fait, c'est-à-dire, chacun de ces sérums renferme à l'état normal de l'antihémolysine ayant les mêmes caractères de spécificité que ceux que nous avons observés dans du sérum humain.

1. Tout récemment (*Centralblatt für Bakter.* 1901, p. 175), M. Muller a publié un intéressant mémoire sur la production de l'antihémolysine et notamment de l'antifixateur chez des lapins auxquels on injecte du sérum chauffé de poule (le sérum de poule non chauffé est hémolytique vis-à-vis des globules de lapin). A la fin de son article, l'auteur signale un fait qui l'a frappé au cours de ses recherches, à savoir que le sérum chauffé de cobaye est antihémolytique, ou mieux antifixateur, vis-à-vis du sérum de lapin immunisé contre les globules de cobaye. M. Muller constate ce fait en passant sans y insister.

Après nous être étendu si longuement sur le sérum humain, il est inutile d'examiner individuellement chacun de ces sérums; disons seulement que, pour avoir dans chaque cas de l'hémolysine spécifique, nous nous sommes adressé tantôt au cobaye, tantôt au lapin; quelquefois nous avions, pour la même espèce de globules, de l'hémolysine provenant de cobaye et de lapin, ce qui nous permettait de juger comparativement de leurs fixateurs respectifs.

Nous nous contenterons de rapporter ici brièvement l'expérience avec du sérum de mouton.

Pour révéler la présence de l'antihémolysine dans ce dernier, nous avons immunisé avec du sang défibriné de mouton à la fois des cobayes et des lapins; nous avons essayé chaque fixateur séparément, en le réactivant dans les deux cas avec de la cytase de lapin; cette cytase est, à petite dose, sans action sur les globules de mouton.

Dans cette expérience, nous nous sommes servi de l'hémolysine provenant de lapin, vacciné contre les globules de mouton; il s'agissait donc du fixateur et de la cytase de lapin. Dans une série de tubes, nous avons mis en contact avec 2 gouttes de cette hémolysine (non dissociée) tantôt 20, tantôt 25 gouttes de divers sérums chauffés à 55-56°. Les sérums employés provenaient de mouton, de lapin, de l'homme (urémie), de bœuf, de cheval et de poule. Après plusieurs heures de contact, nous avons ajouté des globules de mouton, frais, lavés et émulsionnés dans de l'eau physiologique (à 0,75 0/0). Le lendemain, nous avons constaté dans tous les tubes contenant du sérum étranger une diffusion d'hémoglobine ou une dissolution plus ou moins prononcée des globules; seul, le tube contenant du sérum de mouton chauffé à 55° ou même non chauffé, est resté clair[1].

La même expérience, faite avec du fixateur provenant du cobaye et avec de la cytase de lapin, donna les mêmes résultats. Il en fut de même lorsqu'on faisait varier un peu l'expérience, en préparant d'abord le mélange du fixateur *seul* et du sérum à examiner, et n'ajoutant la cytase qu'à la fin. Nous avons employé les deux procédés concurremment pour tous les fixateurs de mouton et de l'homme.

*
* *

Cette expérience, qui démontre la présence de l'antihémolysine dans du sérum normal de mouton, est intéressante encore à un autre point de vue.

1. Le sérum de chèvre renferme naturellement une substance protectrice vis-à-vis des globules de mouton, à un degré très prononcé.

Elle nous montre que, quel que soit l'animal fournisseur de l'hémolysine, la nature du fixateur reste la même. Nous trouvons un autre exemple du même genre pour le fixateur des globules humains. Nous avons vacciné avec du sang humain une chèvre, des lapins et des cobayes. Or, tous ces fixateurs se sont comportés de la même façon, en présence de sérums humains et d'animaux ; d'où nous concluons que tous ces fixateurs, spécifiques pour la même espèce de globules, ne font qu'un.

Quand on compare entre eux simultanément les trois fixateurs des globules humains (chèvre, lapin, cobaye), ou bien les deux fixateurs des globules de mouton (lapin, cobaye), on constate que, combinés à la même cytase, ces fixateurs ne diffèrent entre eux que quantitativement ; ceci peut tenir au fait que les animaux n'ont pas été immunisés au même degré, ou bien à ce que les différents fixateurs, placés dans des milieux différents, ne présentent pas la même affinité pour la même cytase. La parenté des fixateurs entre eux ressort même de l'examen des détails. Ainsi, lorsqu'on examine comparativement une série de sérums mélangés à une hémolysine, on voit qu'il y a des sérums qui empêchent la dissolution plus que les autres; on peut même construire sous ce rapport toute une échelle de sérums, pour chaque espèce des globules. Or, quel que soit le fixateur employé, cette gradation dans le degré de solubilité suit le même ordre à peu d'exceptions près, ce qui nous apporte un argument de plus en faveur de l'identité des fixateurs de provenances différentes.

Ceci établi, il n'y a qu'un pas à faire pour admettre que le fixateur fabriqué par l'animal, lors de la résorption de ses propres globules, ou l'auto-fixateur, est identique au fixateur fabriqué par l'animal étranger.

La présence d'anti-auto-fixateur dans du sérum normal devient alors très compréhensible, et l'on s'explique d'une manière bien naturelle comment l'auto-fixateur et l'anti-auto-fixateur prennent naissance au cours de la vie physiologique de l'animal[1].

1. Avant de terminer le chapitre sur les propriétés antihémolytiques des sérums normaux, nous voudrions faire part au lecteur d'une objection qu'à un moment donné nous avons cru pouvoir formuler contre nos propres conclusions.

Le fait que le sérum humain, par exemple, empêche la dissolution pes

*
* *

Le désir de vérifier le principe de l'auto-protection cellulaire sur le plus grand nombre possible d'espèces animales nous a fait examiner, en plus des sérums indiqués, aussi ceux de cheval, de chien et de bœuf. Nous avons immunisé toute une série d'animaux avec du sang défibriné de cheval, de bœuf et de chien et quand nous avons été en possession d'hémolysines puissantes, nous commençâmes à chercher la propriété antihémolytique dans ces sérums comme nous l'avions pratiqué pour d'autres espèces.

Or, quelle ne fut pas notre déception quand nous constatâmes que ce principe n'est pas du tout applicable ni au sérum de cheval, ni à celui de bœuf, ni surtout à celui de chien. Lorsque, dans une série de tubes, nous fîmes le mélange d'hémolysine de chien avec différents sérums chauffés, le sérum de chien y compris, et qu'au bout de quelques heures nous y ajoutâmes des

globules humains beaucoup mieux que ne le font les sérums des différents animaux, pourrait s'expliquer, peut-être, avons-nous pensé, par le fait que ces sérums d'animaux renfermeraient une substance fixatrice (sensibilisatrice) naturelle qui fait défaut dans le sérum humain; qu'il en serait de même pour le sérum de lapin vis-à-vis des globules de lapin, dans le sérum d'oie vis-à-vis des globules d'oie, etc. On s'expliquerait alors pourquoi les sérums étrangers empêchent moins la dissolution des globules donnés que leurs sérums propres. Or, il suffit d'examiner cette hypothèse de près, même en admettant qu'elle soit juste dans toute l'acception du terme, ce qui n'est pas le cas, pour s'assurer que la conclusion que nous avons tirée de nos expériences conserve toute sa rigueur.

L'hypothèse de fixatrices naturelles est certainement vraie dans certains cas isolés. Ainsi, nous pensons que le sérum de lapin, par exemple, renferme une fixatrice pour les globules humains, ou mieux, une substance qui favorise la dissolution de ces derniers en présence de l'hémolysine; mais cette propriété, qui est déjà très peu prononcée dans le sérum de lapin, existe à l'état d'ébauche dans certains autres sérums et n'existe pas du tout dans la majorité des cas.

Pour ce qui concerne le sérum de lapin, il est facile de mettre en évidence sa propriété fixatrice préformée, si on compare le sérum chauffé à 55° avec le même sérum chauffé à 68° pendant 1-2 heures; on constate alors que, contrairement à la majorité des sérums, ce dernier, chauffé à 68°, empêche la dissolution des globules humains notablement mieux que le sérum à 55°, dans lequel la substance sensibilisatrice n'a pas été détruite.

Mais le sérum de lapin, même débarrassé de sa substance fixatrice, est encore loin d'empêcher la dissolution des globules humains, en présence d'une hémolysine, aussi bien que le sérum humain. L'objection que nous avons formulée plus haut se trouve donc de la sorte dénuée de fondement.

globules de chien, nous vîmes le lendemain que, dans tous les tubes la dissolution de globules était très prononcée, et qu'elle était au maximum dans le tube contenant du sérum de chien, là précisément où nous nous attendions à trouver des globules complètement intacts.

Le même phénomène, quoique sous une forme plus atténuée, fut constaté pour les globules de cheval et de bœuf.

L'expérience fut répétée plusieurs fois avec des doses d'hémolysine de plus en plus petites, et toujours avec le même résultat décourageant.

Or, en cherchant un peu, nous avons vu que cette exception à la règle n'en est pas une, et que les résultats si inattendus de l'expérience tiennent simplement à la fragilité des globules de cheval, de bœuf et de chien; ces derniers sont particulièrement fragiles.

Il suffit d'ajouter des globules rouges de chien à différents sérums chauffés à 55°, de les agiter de temps à autre, pour obtenir une hémolyse très prononcée, sans que l'on fasse intervenir l'hémolysine spécifique; et, chose étrange, contrairement à ce que l'on observe pour les globules de la grande majorité d'espèces animales, les hématies de chien, de bœuf et aussi de cheval, qui se détruisent si facilement dans des sérums sanguins, même chauffés, restent complètement intacts dans de l'eau physiologique (à 0,75 0/0) et cela pendant plusieurs jours de suite.

Comme la diffusion de l'hémoglobine dans le sang de cheval et celui de chien s'effectue déjà spontanément sans hémolysine, il est tout naturel que nous ayons complètement échoué dans nos recherches d'antihémolysines.

*
* *

En résumé, sur neuf espèces animales que nous avons étudiées (cobaye, lapin, poule, oie, mouton, homme, cheval, chien et bœuf), nous avons constaté le pouvoir antihémolytique dans six cas; les trois cas négatifs, qui semblaient au premier abord présenter une exception au principe de l'autoprotection des cellules, trouvent en réalité une explication simple et n'infirment nullement la règle.

*
* *

Au cours de ces expériences, nous avons eu souvent à cher-

cher le pouvoir anticytasique de différents sérums par rapport à des cytases d'animaux différents.

Nous comptons revenir sur ce sujet avec plus de détails une autre fois ; ici nous voudrions seulement attirer l'attention sur la question des auto-anticytases[1].

Disons de suite que le fait de la présence dans un sérum normal d'auto-anticytase est loin d'être aussi général que celui d'auto-antifixateur [2].

Si peu que l'on soit renseigné sur la nature des fixateurs, on sait au moins dans quelles conditions elles prennent naissance, on peut les créer à volonté ; or, pour ce qui concerne les cytases, se trouvant normalement dans le sérum normal et pouvant agir sur les cellules d'autres espèces, nous en savons encore beaucoup moins ; nous ignorons complètement les conditions nécessaires pour leur production, de même que leur rôle physiologique dans la nature. Le seul fait certain est que les cytases contribuent à la dissolution des éléments cellulaires, imprégnés de fixateurs ; peut-être donnent-elles lieu, à ce titre, à des phénomènes d'auto-intoxication, ce qui expliquerait la présence d'auto-anticytase dans quelques sérums normaux.

Au reste, ce n'est qu'une hypothèse. Ce qui est un fait expérimental, c'est la propriété que possède le sérum de lapin, chauffé à 55°, de neutraliser l'action de sa propre cytase.

Ainsi, nous savons que le sérum frais de lapin dissout facilement à certaines doses les globules rouges de cobaye ; or, si l'on ajoute à un tel sérum de lapin une quantité déterminée (10 parties environ) du même sérum ou d'un sérum d'un autre lapin, préalablement chauffé à 55°-56°, on empêche la dissolution de globules de cobaye de se faire, tandis que l'addition d'un sérum chauffé d'un autre animal (oie, poule, bœuf, bouc, homme, etc.) n'empêche pas l'action dissolvante de la cytase de lapin.

En désignant les substances anticytolytiques sous les termes auto-anticytase ou auto-antifixateur, nous voulons indiquer le fait brut qu'il s'agit d'un anticorps spécifique d'un sérum vis-à-vis de la cytase ou du fixateur de même espèce ; les termes anti-autocytase ou anti-autofixateur impliquent l'idée que c'est l'animal lui-même qui fabrique à la fois les cytolysines et les anticytolysines correspondantes.

2. Tout dernièrement (*Soc. de biol.*, 6 juillet 1901), MM. Camus et Pagnier ont signalé le fait intéressant que, dans certains cas, le sérum humain chauffé empêche le sérum humain non chauffé de dissoudre les globules de lapin.

Nous avons voulu savoir si cette action empêchante du sérum chauffé de lapin s'exerce spécifiquement vis-à-vis de la cytase de lapin, ou bien si elle existe également lorsqu'on fait agir sur les globules de cobaye une cytase d'un autre animal, celle de mouton ou de bœuf, par exemple.

L'expérience, réalisée avec le sérum frais de mouton et de bœuf, nous a montré que l'action empêchante ou protectrice du sérum chauffé de lapin disparaît complètement dès que l'on fait agir sur les globu es de cobaye une autre cytase que celle de lapin.

Il s'ensuit donc que, dans le sérum chauffé de lapin, nous avons affaire, non pas à une propriété empêchante ou protectrice, d'une manière générale, mais bien à une propriété spécifique, en ce sens que celle-ci ne se manifeste que vis-à-vis de la cytase de lapin; c'est donc une véritable anticytase que nous observons dans du sérum normal de lapin.

Dans du sérum normal de cobaye, on trouve, à côté de la propriété anticytasique, aussi la propriété protectrice qu'il est souvent difficile de dissocier.

*
* *

CONCLUSION

L'homme et les animaux fabriquent normalement pour leurs propres globules rouges de l'antihémolysine qui est très probablement de l'anti-auto-hémolysine.

*
* *

Dans tout ce travail nous n'avons parlé que de l'antifixateur actif pour les globules rouges; mais c'est la facilité de la technique qui, seule, nous a déterminé à étudier de préférence cette catégorie de cellules. Il y a tout lieu de croire qu'à chaque catégorie de cellules, capables de créer une cytotoxine, correspond dans le sérum sanguin une anticytotoxine spécifique, ou plutôt un antifixateur.

L'équilibre entre le fixateur et l'antifixateur doit être réglé d'une part par le degré de destruction des cellules et, d'autre part, par la force de l'organisme de réagir contre cette destruction.

Cet équilibre s'établit probablement avec le concours et peut-être à l'intérieur même des leucocytes qui président à la

création de ces deux substances, et qui laissent échapper ces dernières dans le sérum, lors de la coagulation du sang. Les choses doivent se passer ainsi à l'état physiologique. Il serait intéressant de voir comment s'opère la réaction antifixatrice, laquelle est évidemment une réatcion de défense, à l'état pathologique, dans les cas où une catégorie déterminée de cellules est lésée; ainsi on peut se demander si, dans les maladies portant sur les organes hémopoïétiques, par exemple, la réaction antihémolytique s'opère avec la même intensité qu'à l'état normal. On peut se demander même si la réaction antifixatrice n'intervient pas dans les phénomènes d'atrophie sénile, surtout depuis que M. Metchnikoff a mis en lumière le rôle des macrophages dans cet ordre de processus.

Juillet 1901.

Errata dans l'article de MM. NICOLLE et ADIL-BEY.

(Numéro du 23 septembre.)

Page 715. — Ligne 25. — Lire « forme des jeunes animaux » et non « forme chez les jeunes animaux ».

Page 716. — Légende de la courbe n° 1. — Lire « Crimée-Anatolie » et non « Crimée et Anatolie ».

Page 717. — Ligne 4. — Lire « virus de passage » et non « sérum de passage ».

Page 718. — Au chapitre *Dilution du virus*, rétablir ainsi la seconde phrase qui a été tronquée « 1/60 de c. c. de sang, dilué dans 1cc,5 d'eau physiologique, tue l'animal qui le reçoit (sous la peau); 1/60 de c. c., dilué dans 500 c. c. d'eau physiologique, ne produit aucun effet, mais vaccine; 1/60 de c. c., dilué dans un litre d'eau physiologique, se montre inactif. »

Page 718. — Ligne 34. — Lire « émulsion de rate gardée » et non « gardés ». La rate a été conservée *in toto* dans l'eau salée.

Page 719. — Ligne 19. — Lire « 10 gouttes » au lieu de « 8 gouttes ».

Ligne 24. — Lire « 8 gouttes » au lieu de « 10 gouttes ».

Page 721. — Légende de la courbe n° 3. — Après « 78-95 » ajouter « race d'Anatolie, 1 an ».

Page 723. — Légende de la courbe n° 6. — Lire « 78-49 » au lieu de « 48-49 ».

Page 730. — Légende de la courbe n° 14. — Lire « 28 II » au lieu de « 18. II » et « sérum sec 0gr,5 » au lieu de « sérum sec 0,15 ».

Page 732. — Légende de la courbe n° 19. — Après « 77-8 » ajouter « race mixte (Crimée-Anatolie) 1 an ».

SUR LE
BACILLE PESTEUX ET LES INJECTIONS INTRAVEINEUSES MASSIVES
DE SÉRUM ROUX-YERSIN DANS LE TRAITEMENT DE LA PESTE

PAR M. J. LIGNIERES

A la suite d'une mission que m'avait confiée M. le comte Sala, ministre de France à Buenos-Aires, je lui adressai un rapport sur l'épidémie de peste bubonique qui sévit au Rosario et à Buenos-Aires (1899-1900). J'y indiquais le résultat de mes observations notamment sur la nature de la maladie, son étendue, son importance, les caractères morphologiques, culturaux et pathogènes, le bacille de Yersin, l'action thérapeutique et préventive du sérum.

Aujourd'hui, les publications sur la peste bubonique sont trop nombreuses pour qu'il soit utile de reproduire ce rapport *in extenso*. Néanmoins, je ne crois pas sans intérêt de faire connaître quelques points qui me paraissent intéressants [1].

De mon étude bactériologique et expérimentale de la peste, je ne retiendrai que deux faits.

Nous savons, depuis le travail de la commission allemande de Bombay, que le bacille de Yersin pousse à des températures basses; cette propriété a même été utilisée comme moyen d'isolement du bacille pesteux.

Il y a plus : non seulement on peut cultiver le bacille de Yersin au-dessous de 25°, mais encore il est indispensable d'éviter l'étuve à 37-38° lorsqu'on fait des cultures diagnostiques avec des produits pesteux provenant de l'homme, de rats ou d'animaux d'expériences. Si le microbe de la peste s'habitue vite à croître à l'étuve (37°) sur nos milieux artificiels, sa première culture est plus difficile; elle peut même manquer.

1. Une partie de mon rapport est publiée dans le *Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire*, Contribution à l'étude des septicémies hémorragiques, août 1900.

Voilà le point nouveau que j'ai maintes fois constaté dans mes expériences. Ainsi le sang d'un rat pesteux trouvé dans une habitation infectée, ensemencé sur des tubes de gélose dont la moitié est laissée au laboratoire (18-20°) et l'autre placée à l'étuve à 38°, donnera parfois des résultats très différents.

Tandis que les cultures mises à l'étuve pourront ne montrer aucune colonie pesteuse même après 4 jours, celles placées à 18-20° présenteront de belles et nombreuses colonies.

Si, d'autre part, on retire les cultures restées stériles de l'étuve à 38° pour les mettre au-dessous de 25°, on verra les colonies apparaître.

Il ne faut donc as employer exclusivement l'étuve à 37-38° pour la recherche du bacille pesteux dans les organes infectés, si on ne veut courir le risque d'un échec.

Le second point sur lequel je désire attirer l'attention, c'est l'aspect spécial très caractéristique de la culture pesteuse sur pomme de terre à 15-20°.

A la température de l'étuve (37-38°), la culture sur pomme de terre est très maigre ou nul e. A 15-20° au contraire, on a toujours un développement visible entre le quatrième et le sixième jour, sous la forme d'un enduit transparent, peu épais, vernissé, blanchâtre. Lorsqu'on fait une seconde culture sur pomme de terre avec la première, on obtient un développement facile. La couche est plus visible, d'abord plate, uniforme, puis, après 8, 10 ou 15 jours, on voit se former de petites élevures parfaitement rondes, légèrement jaunâtres, si denses et si compactes qu'on les détruit très difficilement. Cette culture a alors un aspect *perlé* très caractéristique. Les autres cultures sont toutes perlées.

A propos du traitement sérothérapique de la peste, je crois intéressant de donner connaissance des quelques faits suivants :

Avec l'autorisation de M. le Dr Archambault, directeur du lazaret du Rosario, j'ai eu l'occasion de montrer l'efficacité évidente du sérum Roux-Yersin dans le traitement de la peste. Nous pûmes constater facilement, comme MM. Calmette et Salimbeni, que l'action thérapeutique du sérum est d'autant plus sûre qu'on agit plus vite et à des doses plus élevées, surtout intraveineuses.

L'insuffisance de la quantité du sérum dont nous disposions m'avait engagé fortement, dès le début, à demander au Dr Archam-

bault d'employer presque exclusivement les injections intra-veineuses à haute dose, ce qui lui donna d'ailleurs d'excellents résultats.

Malheureusement le si dévoué directeur du lazaret fut changé, et nos observations au Rosario prirent fin.

De son côté, et probablement sans connaître exactement les faits indiqués plus haut, le Dr Penna, professeur de clinique médicale à la Faculté de Buenos-Aires, directeur du lazaret de cette ville, entreprenait un peu plus tard le traitement sérothérapique de la peste.

J'ai pu voir plusieurs de ses malades traités à l'aide du sérum Roux-Yersin, étudier leur histoire clinique, la marche de la maladie, et me convaincre que le Dr Penna avait fait un pas en avant dans le traitement sérothérapique de la peste par l'application des injections intra-veineuses massives.

Il a montré, en effet, qu'on peut même juguler en 48 heures la maladie grave par l'injection intra-veineuse et d'un seul coup de 60 c. c. de sérum antipesteux, en ayant soin de faire une nouvelle injection intra-veineuse de 40 c. c. après 12 ou 24 heures.

Pour ma part, je suis convaincu qu'en agissant ainsi et en complétant les jours suivants ce traitement par deux injections sous-cutanées de 20 à 40 c. c. de sérum espacées de 24 heures, on arriverait, surtout chez les pesteux traités de bonne heure, à sauver 90 pour cent des malades.

Si le Dr Penna a eu encore 19,3 0/0 de mortalité sur 39 traités, tandis que les non-traités succombaient dans la proportion de 50 0/0, c'est qu'il a eu à sa disposition une si petite quantité de sérum que souvent il a dû le marchander à ses malades.

L'injection de 60 c. c. de sérum par la voie sanguine n'offre guère, à mon avis, plus de dangers que celle qui consiste à en injecter seulement 20 c. c.

En poussant très doucement l'injection et en arrêtant un instant dès qu'apparaissent des phénomènes graves, notamment la suffocation avec cyanose de la face, on évite les accidents mortels. M. Penna ne signale aucun décès imputable à l'injection massive de sérum; de mon côté, je n'en ai jamais constaté.

Quant aux injections préventives pratiquées plusieurs fois sur tout le personnel de mon laboratoire et sur moi-même, elles se sont montrées aussi inoffensives qu'efficaces.

EXISTENCE DES ANOPHELES EN GRAND NOMBRE

DANS UNE RÉGION D'OU LE PALUDISME A DISPARU

PAR M. LE Dr ÉTIENNE SERGENT

Depuis les recherches de Grassi, établissant la relation qui existe entre le paludisme et la présence d'*Anopheles* en Italie, de nombreuses observations, faites en plusieurs points du globe, sont venues confirmer ces résultats.

D'autre part, dans les localités où l'endémie palustre est inconnue, comme la Nouvelle-Calédonie, on n'a point trouvé d'*Anopheles*[1]. Les moustiques du pays sont représentés par le genre *Culex* seul.

En Grande-Bretagne, ces résultats n'ont pas été confirmés par les recherches de Nuttall[2], qui a trouvé des *Anopheles* dans des localités d'où le paludisme a totalement disparu, et même là où le paludisme n'a jamais existé.

Nous avons pratiqué, durant l'été de 1901 (juillet-août-septembre), des recherches sur les Culicides des bords de l'Essonne, affluent de la Seine ; sur les bords de cette rivière régnait autrefois, d'après les médecins locaux, l'endémie palustre : elle a disparu aujourd'hui.

L'Essonne, affluent de la Seine, touche, sur une étendue approximative de 80 kilomètres, à trois départements du centre de la France : Loiret, Seine-et-Marne et Seine-et-Oise. Elle prend naissance sur les confins nord de la forêt d'Orléans, traverse l'ancienne province du Gâtinais, pays boisé, humide ; puis le Hurepois, couvert de forêts et d'étangs, où elle s'élargit avant de se jeter dans la Seine à Corbeil. Elle reçoit le nom d'Œuf dans la première partie de son cours, jusqu'à Aulnay-la-Rivière,

D'après les médecins locaux, l'endémie palustre qui aurait existé autrefois sur les bords de l'Essonne a disparu aujourd'hui.

Sur 14 médecins[3] qui ont bien voulu répondre à nos questions touchant le paludisme dans la région :

1. LAVERAN, Au sujet de Culicides recueillis à Djibouti et en Nouvelle-Calédonie, *Soc. de biologie*, 1er *juin* 1901.

2. NUTTALL, The geographical distribution of Anopheles in relation to the former distribution of ague in England, in the *Journal of Hygiene*, vol. 1, nº 1, janvier 1901.

3. Drs Narbonne (Chambon); Lauret (Neuville-aux-Bois); Augé père, Augé Aug., Prudhomme (Pithiviers); Papillon, Nouët (Puiseaux); Penot, Billard, Guyard (Malesherbes); Dupeu (Maisse); Laroche (Milly); Lernon (Chilleurs-aux-Bois); Durcy-Comte (Corbeil).

Un seul aurait vu, il y a plus de 20 ans, 4 ou 5 cas de fièvre paludéenne; il ne se rappelle plus le type qu'ils représentaient;

Neuf n'ont jamais observé de cas de paludisme;

Trois ont observé des cas *rares* de névralgies faciales cédant à la quinine;

Un aurait observé, il y a 3 ans, un cas de fièvre paludéenne chez un enfant, *fièvre quotidienne cédant à la quinine.*

En somme, d'après ces renseignements, on peut dire que l'endémie palustre n'existe pas sur les bords de l'Essonne, où nous avons trouvé des *Anopheles* en grand nombre.

Sur une longueur d'environ 80 kilomètres, nous avons fait nos recherches sur 30 mares, dans des localités distantes en moyenne de 3 à 4 kilomètres; nous avons recueilli des larves d'*Anopheles* dans 22 de ces mares.

Nuttall[1] insiste sur l'*importance numérique* de la distribution des *Anopheles*, et dit que ces observations *de nombre*, quoique facilement erronées, n'en ont pas moins une valeur relative :

« *We are forced to conclude*, dit-il, *that it is not a matter of the geographical distribution of* Anopheles *as much as of their numerical distribution. We are fully aware that numerical estimates permit a considerable degree of error. Nevertheless they would always possess a relative value.*

Or, nous avons pu comparer nos recherches sur les bords de l'Essonne, au point de vue *numérique*, avec celles que nous avons faites l'année dernière, aux mois d'octobre et de novembre, aux environs d'Alger, dans des foyers avérés de paludisme.

Nous avons trouvé des *Anopheles* plus facilement et en bien plus grand nombre sur les bords de l'Essonne qu'à Maison-Carrée et au Jardin d'Essai, foyers de paludisme près d'Alger. De plus, tandis que dans ces dernières localités, la proportion des *Anopheles* par rapport aux *Culex* était environ de 1/20, sur les bords de l'Essonne nous avons trouvé ce rapport égal à 1/10, approximativement.

Les *Anopheles* recueillis dans la région qui nous occupe appartiennent aux espèces suivantes : *Anopheles maculipennis* (*vel claviger*), *Anopheles bifurcatus*.

La carte ci-jointe indique la distribution des *Anopheles* sur

1. Nuttall, loco cit.

TABLEAU DE DISTRIBUTION DES *ANOPHELES*

JUILLET, AOUT, SEPTEMBRE 1901.

(B indique *A. bifurcatus;* M, *A. maculipennis.*)

DÉPARTEMENT	ENDROIT	Hauteur au-dessus de la mer.	ESPÈCE	NOTES	DATE
		Mètr.			
LOIRET	MALESHERBES.	100	B	Dans un tonneau recueillant l'eau de pluie. *Culex pipiens* et *annulatus.* Au centre du village.	15 juillet 1901
LOIRET	PINSON.	80	M	Ruisseau séparé artificiellement de l'Essonne. Eau stagnante, pure. Prêles, pas de *Culex.* Poissons.	5 août.
SEINE-ET-OISE	BOIGNEVILLE.	80	B	A un kilomètre du village. Trou d'eau sale de 0m,25 de profondeur. *Culex.* Autour de la flaque d'eau, menthe sauvage.	7 août.
SEINE-ET-MARNE	VILLETARD.	76	M	Fossé dans un jardin. Eau pure. *Culex pipiens.* Menthe sauvage sur les bords.	7 août.
LOIRET	DIMANCHEVILLE.		B	Fossé dans un jardin. Eau très sale. *Culex pipiens.*	9 août.
SEINE-ET-OISE	CHEVRAINVILLE.	69	B	Ornière creusée par la roue d'un chariot, 0m,10 de profondeur. Nombreux *Anopheles* avec *Culex.*	13 août.
SEINE-ET-OISE	Ferme BONNEVAUX près GIRONVILLE.	67	B M	Mare d'eau rès sale.	13 août.
SEINE-OISE	Près GIRONVILLE.	68	B	Trou à chaux au milieu de jardins. Eau sale. Le trou a 1m,70 de profondeur, 0m,30 d'eau au fond.	13 août.
SEINE-ET-OISE	Entre COURCELLES et BOIGNEVILLE.	70	B	Trou d'eau au milieu des bois. 1 m. de profondeur. *Culex.*	13 août.
LOIRET	PINSON. (Derrière le moulin.)	79	B	Même ruiss., où le 5 août il a été recueilli des *Anoph. maculipennis.*	15 août.
SEINE-ET-OISE	BOUTIGNY.	67	B	Trou d'eau dans le jardin des employés de chemin de fer. Gare de Boutigny. Eau pure. *Culex.*	17 août.

DÉPARTEMENT	ENDROIT	Hauteur au-dessus de la mer	ESPÈCE	NOTES	DATE
		Mètr.			
SEINE-ET-OISE	JARCY.	59	B	Trou d'eau au milieu de jardins, près le passage à niveau. *Culex.*	17 août.
SEINE-ET-OISE	AUDIGERS.	60	B M	Trou d'eau au milieu de jardins.	17 août.
SEINE-ET-OISE	MAISSE.	64	B M	Trou d'eau dans le jardinet de la gare Eau sale.	17 août.
SEINE-ET-OISE	LA-FERTÉ-ALAIS.	55	M	Trou d'eau au milieu de jardins près de la rivière. *Culex.*	20 août.
SEINE-ET-OISE	BALLANCOURT.	50	M	Diverticule de l'Essonne, séparé de lui artificiellement. Pas de poissons. *Nénuphars.* Roseaux.	20 août.
LOIRET	AULNAY-LA-RIVIÈRE.	90	B M	Ornière dans un champ, près de la rivière. *Culex.*	19 sept.
LOIRET	BONDAROY près PITHIVIERS.	100	M	Trou d'eau dans jardin. Très nombreux *Anopheles. Culex.*	19 sept.
SEINE-ET-MARNE	Entre AUXY et VILLETARD, au lieu appelé *Les Roches.*	78	M	Ancien lavoir près de la route. En juillet, août, pas d'*Anopheles.* En septembre, *Anopheles.*	24 sept.
SEINE-ET-OISE	MENNECY.	54	B	Bassin dans un jardin, près de la rivière. Eau sale.	6 sept.
LOIRET	COURCY.	125	B	Fond d'un étang à moitié desséché. *Culex.* Eau sale.	28 sept.
LOIRET	CHILLEURS-AUX-BOIS.	123	B	Flaque d'eau sale. *Culex.*	28 sept.

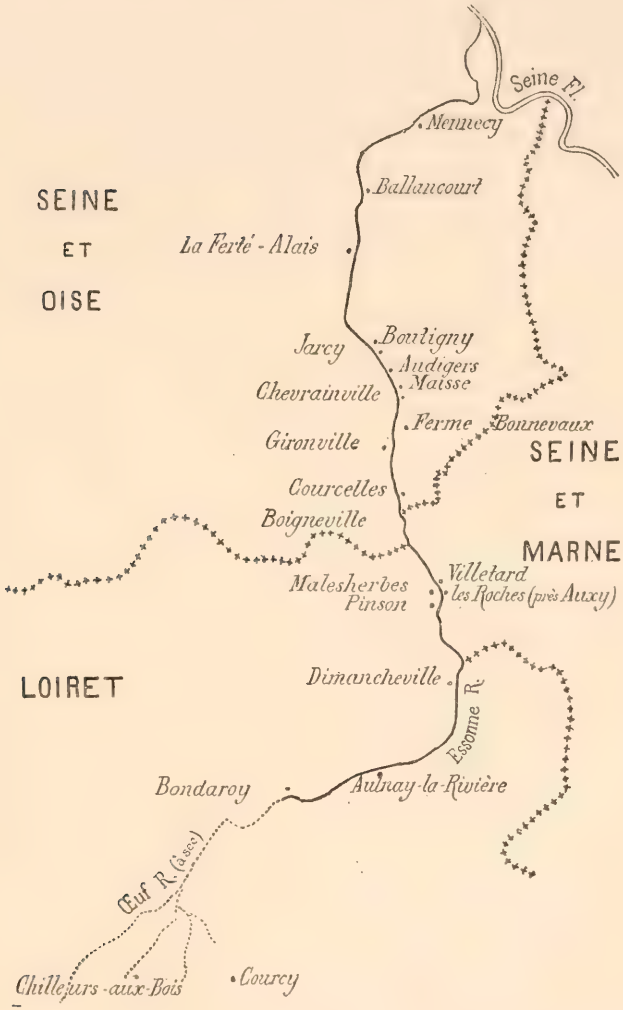
les bords de l'Essonne. Des larves d'Anopheles ont été trouvées dans toutes les localités qui figurent sur cette carte.

Les larves d'*Anopheles* (*A. bifurcatus*, *A. maculipennis*) que nous avons recueillies étaient presque toujours en compagnie de larves de *Culex*.

Nous avons récolté souvent des larves d'*Anopheles* dans des mares à eau très sale; sur 22 mares à *Anopheles*, 9 contenaient de l'eau sale, boueuse. A Chevrainville, de nombreuses larves

d'*A. bifurcatus* ont été trouvées dans une ornière creusée par la roue d'un chariot, au milieu d'un chemin vicinal.

Sur les bords des mares naturelles à *Anopheles*, nous avons



souvent rencontré des menthes sauvages, à odeur forte.

Très souvent des réservoirs artificiels étaient infestés; d'une manière presque constante, nous avons trouvé des *Anopheles* dans les bassins à fleur de terre. communs dans les jardins

potagers (à la condition que l'eau n'y soit pas renouvelée souvent).

Nous n'avons pas trouvé d'*Anopheles* dans les tourbières de l'Hurepois, où l'eau est cependant stagnante, pure, et semble réaliser les conditions favorables au développement des larves.

Le lit de l'Œuf est à sec l'été depuis quelques années; les villages voisins font usage de pompes ou de puits pour les besoins de leurs jardins. Nous n'avons trouvé des *Anopheles* qu'aux sources de la rivière, sources représentées aujourd'hui par des étangs en grande partie desséchés.

CONCLUSIONS

1. Sur les bords de l'Essonne, la disparition du paludisme ne coïncide pas avec celle des *Anopheles*, qui y existent en grand nombre.

2. Nous avons récolté des larves d'*Anopheles* (*A. maculipennis*, *A. bifurcatus*) dans les terres basses, près de la rivière, et très souvent dans des réservoirs artificiels.

3. La disparition du paludisme n'étant pas due à l'extinction des *Anopheles*, ne pourrait-elle pas être due aux différentes causes suivantes, agissant simultanément :

a. Endiguement des rivières. Boisement de leurs bords;

b. Meilleure hygiène des habitants, résultat d'une plus grande aisance. Usage plus répandu du vin;

c. Dans une *certaine mesure*, l'usage de la quinine. Nous disons dans une *certaine mesure*, car la quinine est l'objet, paraît-il, d'un préjugé populaire [1], contre lequel certains médecins de la région ont eu à lutter.

4. L'existence d'*Anopheles* sur les bords de l'Essonne ne constitue-t-elle pas un danger pour les habitants de la région?

Très souvent, des rapatriés des colonies, soldats ou colons, pour la plupart impaludés, reviennent dans leur pays natal; ils ont, justement à l'occasion de ce changement de climat, de nouvelles poussées fébriles; leurs hématozoaires pourraient être transmis aux sujets sains par les *Anopheles*.

1. Dr Nouët (Puiseaux)...

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE NOVEMBRE 1901 No 11

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

VARIÉTÉ MÉLANOGÈNE DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR C. GESSARD.

(Travail de l'Institut Pasteur de Lille.)

On doit à M. le docteur Cassin la découverte d'un microbe que M. Radais[1] a identifié avec le bacille pyocyanique, en même temps qu'il lui reconnaissait la propriété, nouvelle pour cette espèce bactérienne, de donner naissance, dans certains milieux, à un pigment d'abord rouge, puis noir. C'est proprement une variété du bacille pyocyanique qu'on peut appeler *b. mélanogène* ou *de Cassin*. J'ai vu[2] que l'aptitude de ce microbe à produire le pigment rouge et noir était subordonnée à la présence de la tyrosine dans le milieu de culture. J'ai, par suite, assimilé ce pigment au pigment de même couleur que donne la tyrosine sous l'influence de sa diastase oxydante, la tyrosinase.

Rappelons dès le début, en tant que notion utilisable dans le cours de ce travail, que ce ferment, sous la forme de macération glycérinée de certains champignons, constitue un réactif biologique de la tyrosine comparable au réactif chimique, dit de Millon. Tous deux sont oxydants et produisent des colorations rouges dans la solution de tyrosine, puis des précipités avec décoloration de la liqueur, précipités en rapport avec la nature des éléments minéraux de chaque réactif, noir pour la diastase, rouge pour le réactif de Millon. Mais la tyrosinase a, peut-on dire, une spécificité plus étroite, car elle n'agit que sur la tyrosine actuelle, tandis que le réactif de Millon atteint la tyrosine dans la molécule d'albumine où elle est seulement en

1. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1897, p. 808.
2. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1898, p. 1033.

puissance, si l'on admet que cette tyrosine est la cause de la coloration qu'il donne avec les matières albuminoïdes.

J'étudierai dans ce mémoire les fonctions chromogènes du nouveau microbe. Cette étude, poursuivie dans les différents milieux, en parallèle avec les réactions du bacille pyocyanique anciennement connu et avec les réactions des réactifs diastasique et chimique dans ces milieux, doit contribuer à valider les titres de la variété nouvelle, à marquer la place qui lui peut être assignée à côté des autres réactifs de la tyrosine, enfin à vérifier l'assimilation que j'ai faite de l'action chromogène du microbe avec celle de la tyrosinase.

I

MILIEUX DE CULTURE

Milieux salins. — Faisons d'abord la preuve que la présence de la tyrosine est la condition nécessaire de la production du nouveau pigment. Pour cela prenons un milieu de composition connue : ce sera le mélange salin qui m'a déjà servi pour l'étude des fonctions chromogènes des microbes, où le taux du succinate d'ammoniaque sera seulement réduit de 10 à 1 gramme, pour les raisons qu'on trouvera plus loin :

Succinate d'ammoniaque	1 gr.
Phosphate bibasique de soude ou de potasse	5 »
Sulfate de magnésie	2,50
Chlorure de calcium cristallisé	1,25
Eau distillée	1,000 c. c.

La série des expériences dans ce milieu, en vue de la démonstration que nous cherchons, va faire apparaître, comme en un résumé, les influences respectives et réciproques du microbe et du milieu, telles qu'elles entrent en jeu dans tout phénomène microbien.

Par exemple, pour la composition ci-dessus, le bacille pyocyanique ordinaire donne bien ses deux pigments, le bleu de la pyocyanine et le vert fluorescent, auxquels succède la couleur habituelle du vieillissement, la teinte feuille morte. Le nouveau germe ne se comporte pas autrement. Sa fonction spéciale n'a pas d'application en l'absence de l'élément approprié.

Mais ajoutons à notre mélange 0.5 pour 1,000 de tyrosine. Ce même germe va y donner naissance à une belle coloration rose qui passe au rouge acajou, reproduisant ainsi la succession de couleurs que donne la tyrosinase dans une solution de tyrosine. Avec le bacille ordinaire, au contraire, il n'y a pas de changement : la culture a le même aspect que dans le mélange dépourvu de tyrosine. Cet élément est comme s'il n'existait pas, en dehors de l'aptitude spéciale du microbe à le mettre en œuvre.

La production du pigment rouge, qui résulte de la coexistence de la tyrosine et du microbe spécialement doué, dépend encore d'un certain rapport entre les éléments constituants du milieu. Elle est compromise si ce rapport est troublé. Par exemple, si nous portons à 2 grammes la proportion de succinate d'ammoniaque, *a fortiori* si nous la relevons au chiffre ancien de 10 grammes par litre, nous voyons que le microbe ne donne plus le pigment rouge de la tyrosine : l'aspect est celui d'une culture en milieu dépourvu de tyrosine, et montre simplement les pigments ordinaires du bacille pyocyanique. Toutefois le vieillissement imprime, aux cultures faites dans ces dernières conditions de milieu, des modifications sur lesquelles nous aurons à revenir.

Enfin, avec les conditions requises de composition élémentaire du milieu et d'aptitude fonctionnelle du microbe, il faut encore tenir compte du degré d'énergie du germe, on dirait de sa virulence, avec une autre unité de mesure qu'une apparition de pigments. Tel germe révèle sa spécificité et produit le pigment rouge dans le mélange à 0,5 de tyrosine et 1 gramme de succinate d'ammoniaque pour 1,000, ainsi que nous l'avons vu. Tel autre, toutes choses égales d'ailleurs, ne peut faire prédominer le rouge que si la proportion de succinate d'ammoniaque est abaissée à 0,75. Un troisième, dégénéré entre mes mains, comme c'est fréquemment le cas dans les vicissitudes du laboratoire, ne supporte que 0,25 de succinate d'ammoniaque. Au delà de ces limites respectives, ces différents germes ne produisent que les pigments pyocyaniques ordinaires. Il y a donc, pour influencer la production du nouveau pigment et des pigments pyocyaniques ordinaires, comme un balancement entre la tyrosine et le succinate d'ammoniaque, et la détermination en faveur de l'un ou de

l'autre pigment réside dans un rapport de proportions entre les deux éléments, variable avec la vigueur du germe. J'ai montré autrefois qu'il en était de même pour l'élément azoté et l'élément phosphaté, au regard des fonctions pyocyanogène et fluorescigène du bacille pyocyanique ordinaire.

Dans les conditions de milieu les plus favorables à la production du pigment rouge, les pigments pyocyaniques ordinaires peuvent encore apparaître, d'une manière éphémère, à vrai dire, tout au début de la culture. On les exclut à coup sûr en supprimant le succinate d'ammoniaque. Le microbe peut se cultiver en série dans le milieu salin, réduit ainsi à la tyrosine comme aliment azoté et hydrocarboné. La coloration rose ne se fonce pas beaucoup dans ce cas. Enfin, dans une simple solution de tyrosine à 0,5 0/00, on peut encore entretenir des cultures en série, assez pauvres, à la vérité : le liquide rosit lentement, reste limpide et d'un rose faible. C'est la reproduction expérimentale des cas, qui ne sont pas rares, où la solution de tyrosine se colore spontanément, par ensemencement accidentel de quelque germe propre à cet effet, comme il en existe certainement en dehors de notre bacille.

Dans le milieu salin, qui contient seulement de la tyrosine ou, avec la tyrosine, du succinate d'ammoniaque sous la dose où le pigment rouge apparaît seul, la couleur des cultures se maintient au rouge acajou. D'autre part, dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine, ce même rouge acajou est, comme on sait [1], la seule couleur imputable au ferment lui-même, et la seule qu'on obtienne quand on emploie la solution glycérinée de tyrosinase sous la moindre dose. La couleur noire et le précipité noir, qui succèdent au rouge dans les expériences avec la tyrosinase, sont dus, rappelons-le, aux sels, que fournit en quantité suffisante la solution diastasique, quand elle est employée à forte dose, ou qu'on ajoute, pour les doses faibles, dans la solution de tyrosine. Cette adjonction de sels est bien réalisée dans notre milieu salin : aussi, même avec la plus faible dose de solution diastasique, on y voit succéder au rouge la couleur noire, puis le précipité noir avec décoloration de la liqueur.

Quand la couleur rouge, dans ce même milieu, est due au

1. Ce Volume, p. 594.

microbe, on n'observe plus pareils changements, ni spontanément, ni même par addition après coup d'un excès d'un sel alcalino-terreux, secondée même de l'action de la chaleur, toutes conditions propres, comme nous savons, à favoriser le passage au noir [1]. En sorte que l'aspect des cultures dans ce milieu salin justifie mal le nom de mélanogène que je propose pour la nouvelle variété de bacille. Comment expliquer cette divergence, si l'ensemble de nos expériences nous permet d'identifier complètement par ailleurs les pigments d'origines diastasique et microbienne? Il faut vraisemblablement l'attribuer à quelqu'une de ces actions empêchantes [2], comme celles qu'exercent les matières organiques sur un si grand nombre de réactions chimiques, et qui pourrait dépendre ici de quelque produit de la vie microbienne.

Revenons maintenant au milieu salin qui contient tyrosine et succinate d'ammoniaque, et où le microbe n'a produit que les pigments bleu et vert, comme un bacille pyocyanique ordinaire. Cette ressemblance ne s'étend pas à toute la durée de la culture, car, en vieillissant, la culture prend une teinte rougeâtre et aboutit, en dernière analyse, non plus à la teinte feuille morte accoutumée dont le ton dominant est l'orangé, mais à une teinte brun foncé, qu'on ne peut mieux comparer qu'à la couleur de l'infusion de café, et que n'atteint jamais le milieu salin qui ne contient que de la tyrosine sans succinate d'ammoniaque. Le rouge acajou, dans ce dernier cas, le brun café dans les autres cas où le rouge manque ou n'est qu'éphémère, dénoncent donc la tyrosine dans les milieux salins, de façon plus ou moins rapide, mais également sûre.

1. J'ai retenu cette différence d'effet de l'alcalino-terreux pour distinguer le pigment rouge d'origine diastasique du pigment rouge d'origine microbienne (ce Vol. p. 603.) L'ébullition simple peut servir aussi, mais pour le rose du début seulement : le rose dû à la diastase se décolore ; le rose dû au microbe résiste à cette épreuve. Mais, même avec la diastase, cette décoloration par la chaleur n'est plus complète, quand le pigment s'est foncé et oxydé à l'air.

2. *Action empêchante de l'albumine de l'œuf de poule.* — Si l'on fait des dilutions albumineuses de tyrosinase au 1/2, au 1/3, au 1/4, etc. (en mêlant 1 goutte de solution glycérinée de diastase avec 1, 2, 3 gouttes, etc., d'albumine d'œuf), qu'on introduise 1 goutte de chaque dilution dans 2 c. c. de solution de tyrosine, et qu'après formation du pigment on ajoute un excès de chlorure de calcium, on obtient le précipité avec décoloration de la liqueur pour 1/2, des précipités partiels qui laissent la liqueur colorée pour 1/3 et 1/4. Pour les dilutions plus étendues, la précipitation ne se fait plus, au lieu qu'elle est toujours possible, quand on s'est servi d'eau pour les mêmes dilutions.

La tyrosine fait partie de beaucoup de produits naturels. Voyons comment le microbe sait la reconnaître dans les milieux de culture que fournissent ces produits.

Pomme de terre. — La tyrosine révèle déjà sa présence dans la pomme de terre par le noircissement du suc sous l'influence du ferment oxydant qui s'y trouve également contenu. Il va de soi que ce ferment est détruit par la cuisson et qu'il ne s'agit que de l'action du microbe dans les effets que nous pourrons constater. Le milieu est, comme on sait, très favorable aux fonctions chromogènes des microbes en général, à celles du bacille pyocyanique en particulier, que la pomme de terre soit sèche ou qu'elle baigne en partie dans du bouillon peptoné glycériné, selon la formule qui sert à la culture du bacille tuberculeux. Dans ce dernier cas, le bacille pyocyanique offre le plus souvent un beau vert bleu velouté, à la partie supérieure de la pomme de terre, où l'air afflue, harmonieusement fondu par dégradation insensible avec le jaune de la pyocyanine réduite des parties inférieures moins aérées. C'est aussi l'aspect que présente d'abord la culture du bacille mélanogène. Puis, peu à peu, le noir se substitue à ces brillantes couleurs, envahit à leur suite toute la pomme de terre, et lui donne l'apparence d'un bloc de cirage, suivant l'expression imagée de M. Radais. Sur la pomme de terre sèche, c'est d'emblée une teinte rouge marron d'aspect luisant, qui rappelle une culture de morve. Elle passe plus ou moins rapidement au noir brillant.

Œuf. — Étudions séparément le jaune et le blanc.

La tyrosinase révèle dans le jaune la présence de la tyrosine sous l'état où elle peut la déceler, c'est-à-dire dégagée de la molécule albuminoïde. En effet, si l'on mélange la solution glycérinée diastasique avec le jaune d'œuf, on voit la partie superficielle se colorer en noir après quelques heures. La viscosité limite l'accès de l'air, partant l'extension de la coloration en profondeur. Mais il suffit de ramener les parties inférieures à la surface, pour les voir noircir à leur tour au contact de l'air. J'ai mis un soin particulier à vérifier cette présence de la tyrosine dans le jaune d'œuf, parce que, à ma connaissance, elle n'y a pas été signalée jusqu'ici. J'ai obtenu sa réaction diastasique dans le jaune d'un œuf tout récemment pondu. D'autre part, j'ai fait trois décoctions successives, de même durée, du même

jaune dans la même quantité d'eau : la quantité de tyrosine s'est trouvée fort réduite dès le second produit de décoction. La tyrosine préexiste donc bien dans le jaune d'œuf frais.

Le bacille pyocyanique ordinaire donne, dans le jaune d'œuf, cette couleur rouge brun qu'a signalée autrefois M. Rohrer [1].

La variété mélanogène y produit rapidement une couleur noire. Il faut seulement avoir soin d'ajouter de petites quantités d'eau distillée stérilisée, au début ou au cours de la culture, pour obvier à l'épaississement du milieu à la chaleur de l'étuve, en même temps qu'on renouvelle par agitation les surfaces exposées à l'air pour que toute la masse se colore.

Le blanc d'œuf, au contraire, ne se colore pas par la tyrosinase. J'ai prolongé l'observation, en me rappelant le long retard que j'avais vu apporter par l'albumine à la réaction de la tyrosinase sur la tyrosine. Je ne suis pas assuré encore que de la tyrosine n'y existe pas, qui se déroberait à ce moyen de recherche, à la faveur du grand excès de matière empêchante [2].

M. Gayon, dans ses *Recherches sur les altérations spontanées des œufs* [3], admet, avec les auteurs, qu'il existe des traces de tyrosine dans le blanc d'œuf. Il décrit, en même temps, une curieuse transformation de l'albumine de l'œuf, où, « sans développement corrélatif d'organismes », apparaît une notable quantité de tyrosine, dispersée dans la masse en amas de cristaux aiguillés. Ma méthode, mise en œuvre sur des œufs frais, ne m'a jamais rien montré de pareil. Il est tout au moins digne de remarque que le microbe non plus n'y révèle pas la présence de la tyrosine dans le blanc d'œuf. Le bacille mélanogène ne se comporte pas autrement que le bacille ordinaire, et ne donne naissance, dans le blanc d'œuf, qu'au pigment vert fluorescent, lequel aboutit à la teinte feuille morte. Toutefois on voit aussi, dans certains cas, survenir, après un temps prolongé, la teinte brun café que nous avons vue déjà, caractéristique de la tyrosine en milieu salin âgé. Contentons-nous, pour l'instant, d'enregistrer cette particularité ; elle se rattache à une série de faits que nous étudierons ensemble.

La cuisson rend le milieu bien différent, aussi bien pour le

1. *Centralblatt f. Bakteriologie*, 1892, p. 333.

2. 0,005 de tyrosine, introduits sous le moindre volume d'eau dans 100 c. c. d'albumine, ont pourtant été bien révélés par le réactif diastasique.

3. *Thèse de la Faculté des Sciences*, Paris, 1875.

bacille mélanogène que pour le bacille ordinaire. Le blanc d'œuf coagulé est mieux approprié à la fonction pyocyanogène de ce dernier. De la pyocyanine y apparaît aussi avec le mélanogène; du brun et du noir y succèdent, et finalement toute la masse blanche est convertie en beau noir. Cependant la tyrosinase n'indique encore que peu de tyrosine dans ce blanc coagulé, et, par contact prolongé, lui communique seulement une légère teinte chamois. Nous retrouverons, à propos des autres matières albuminoïdes, ce contraste entre les données de la diastase et les effets de l'action microbienne, et nous aurons à en chercher l'explication.

Quoi qu'il en soit, il résulte de cette propriété du microbe qu'un œuf dur, ensemencé à travers la coquille et dans le jaune avec un germe mélanogène, se transforme tout entier, au bout d'un certain temps, en une masse noire d'aspect de putrilage. Cette transformation s'accompagne d'une odeur valérianique prononcée, qui caractérise fréquemment les cultures mélanogènes dans les milieux albuminoïdes.

Lait. — Le lait fournit un bon aliment aux fonctions chromogènes du bacille pyocyanique, généralement après que celui-ci l'a transformé par la présure et la caséase qu'il sécrète. Mais cet ordre de succession des phénomènes n'a rien d'absolu, et la température, l'aération, la forme du vase d'où dépend l'accès de l'air, favorisent plus ou moins l'un ou l'autre phénomène, ou les font coexister. Le bacille mélanogène fait du lait un liquide noir d'encre, après qu'il y a déterminé les transformations et les colorations habituelles. Cependant la tyrosinase ne communique au lait qu'une légère teinte rose, laquelle n'implique que peu de tyrosine. Nous retrouvons ici le contraste entre les réactions diastasique et microbienne, que le blanc d'œuf nous a déjà montrées, et dont le milieu suivant va nous offrir encore un plus frappant exemple.

Peptones. — Les peptones sont les produits de transformation des albuminoïdes par l'une des diastases protéolytiques, pepsine ou trypsine, qui en font de la peptone pepsique ou pancréatique. Le réactif de Millon ne distingue pas entre les deux produits : il les colore en rose tous deux, comme les albuminoïdes dont ils sont dérivés. Il n'en est pas de même de la tyrosinase, que M. Harlay[1]

1. *Thèse de doctorat de l'École supérieure de Pharmacie de Paris*, 1900.

a pu proposer pour reconnaître la nature d'une peptone. En l'appliquant comme réactif à cette recherche, il a confirmé et mis à profit le fait que l'action de la pepsine ne sépare pas la tyrosine engagée dans la molécule albuminoïde, tandis que la trypsine, réalisant une dislocation plus complète de cette molécule, libère la tyrosine et la met, par conséquent, dans la peptone pancréatique, sous l'état où la tyrosinase peut agir sur elle. Aussi la tyrosinase donne-t-elle les colorations rouge et noire dans la peptone pancréatique, au lieu que, dans la peptone pepsique, c'est une couleur rouge qui passe au vert olive, au bout de quelques heures.

Comment le microbe va-t-il se comporter dans l'un et l'autre milieu? Comme nous l'avons constaté plusieurs fois déjà, au début les cultures des deux bacilles pyocyaniques ne diffèrent pas. Mais, en vieillissant, les cultures du bacille ordinaire prennent les teintes habituelles, feuille morte ou rougeâtre, suivant qu'y a prédominé le pigment vert ou le bleu. Dans les cultures mélanogènes des deux peptones, une teinte brune apparaît bientôt sous ces pigments vert ou bleu en débutant par la surface, s'y substitue en gagnant en profondeur, se fonce toujours plus, et finalement tout le liquide est brun noir. Ainsi, le microbe, comme le réactif de Millon, confond les deux peptones dans une réaction commune et, à l'inverse de la tyrosinase, ne tient pas compte de l'état sous lequel la tyrosine y préexiste. Mais, avant d'approfondir ce phénomène, achevons l'étude des milieux par la gélatine et le bouillon, sur lesquels nous pourrons moins nous appesantir.

Gélatine. — J'ai vu autrefois que, sans addition d'autre aliment, la gélatine[1] peut servir au développement du bacille, sinon à l'élaboration des pigments pyocyaniques. Elle ne contient de tyrosine sous aucun état, comme le montre l'absence de coloration par le réactif de Millon. Le microbe n'y donne pas non plus du pigment correspondant. On ne peut y étudier que le pouvoir liquéfiant : l'étude comparative des deux bacilles pyocyaniques attribue la supériorité au microbe de Cassin.

Bouillon. — J'insisterai, comme j'ai fait déjà, sur l'avantage qu'il y a, pour l'analyse des fonctions microbiennes, à ne com-

1. Solution de gélatine à 100 0/00, clarifiée avec un blanc d'œuf, soit 30 grammes, qui peut bien apporter quelque élément nutritif dans le mélange.

prendre et à n'employer sous ce nom que le simple produit de la décoction de la viande [1], sans aucune autre addition. Notre nouvelle variété de bacille va témoigner encore, par la distinction qu'elle fait entre le bouillon et la peptone, de l'intérêt qu'il y a à ne pas mélanger l'un et l'autre, comme font beaucoup de formules de milieux de cultures.

Il n'y a que des traces de tyrosine dans le bouillon de veau, comme l'indique un faible rose par le réactif de Millon, à peine une teinte ambrée par la tyrosinase. Le bacille mélanogène ne décèle pas ces faibles traces : sa culture en bouillon n'est différente, à aucun moment, de celle du bacille pyocyanique ordinaire. Sa ressemblance avec ce dernier se complète par la possibilité de constituer, au regard du bouillon, des races qui y produisent une de la fluorescence verte seulement, une autre seulement de la pyocyanine, une troisième enfin qui n'y produit pas de pigment; toutes races qui, reportées en peptone, y manifestent uniformément la fonction pyocyanogène, caractéristique de l'espèce, puis la fonction mélanogène, caractéristique de la variété. J'ai cherché, par la méthode des cultures en plaque, des représentants de ces différentes races dans les cultures du mélanogène type, c'est-à-dire, qui produit à la fois les pigments vert et bleu dans le bouillon. Ces cultures, en effet, ne sont pas plus homogènes, c'est-à-dire composées de cellules toutes douées d'aptitudes égales, que ne le sont les cultures microbiennes en général : elles m'ont fourni, juxtaposés au type complet, les différents types de dégradation qui correspondent à la perte d'une ou des deux fonctions pigmentaires.

II

DISCUSSION DES RÉSULTATS

De l'ensemble des faits qui précèdent on conclura :

La tyrosine est nécessaire à la production du nouveau pigment du bacille pyocyanique.

Ce pigment est identique à celui que donne la tyrosine sous l'influence de la tyrosinase des champignons.

1. Décoction d'une demi-heure, de viande de veau, pour obtenir 2 parties de ouillon, qu'on neutralise simplement.

Il y a, dès lors, de grandes présomptions pour que l'agent de cette transformation de la tyrosine par le microbe soit cette même tyrosinase.

On admet volontiers aujourd'hui que mainte action microbienne s'exerce par l'intermédiaire d'une diastase sécrétée par le microbe. Il s'en faut pourtant que, dans tous les cas où cette conclusion est admise, on ait relevé des analogies aussi étroites que dans le cas qui nous occupe, entre l'action du microbe et l'action d'une diastase bien connue d'autre part. Identité de la substance passive, identité de la transformation qu'elle subit; la conclusion logique semble bien : identité de l'agent de cette transformation.

Certes la preuve sans réplique manque : je n'ai pu déceler la tyrosinase ni dans les cultures ni dans l'eau de lavage des corps microbiens. Il faudrait peut-être déchirer les cellules comme Buchner l'a fait pour trouver sa zymase, mais un bacille se prête moins à cette opération qu'un globule de levure, et je n'ai pas poussé plus loin cette recherche.

Considérons encore, en faveur de l'existence de la tyrosinase microbienne, combien la tyrosinase est répandue dans la nature, partie intégrante de tant de végétaux divers : betterave, dahlia, pomme de terre, nombreuses espèces de champignons, etc. Nous accepterons alors sans peine que, semblable en cela à plusieurs autres diastases, elle puisse tout à la fois être un produit d'êtres d'organisation complexe, et figurer dans les sécrétions des êtres les moins différenciés morphologiquement, les organismes monocellulaires. De ce point de vue on serait plutôt fondé, pour le dire en passant, à s'étonner que la tyrosinase ne se rencontrât pas aussi, quelque jour, dans l'économie animale, où elle n'a pas été signalée jusqu'ici.

*
* *

Tenons donc pour démontré que la tyrosinase existe dans le microbe et qu'elle lui sert à élaborer le pigment rouge aux dépens de la tyrosine. Il reste à comprendre que, dans certains milieux où la tyrosinase des champignons ne nous a révélé que de faibles quantités de tyrosine, le microbe, avec sa diastase identique, ait produit une quantité de pigment qui correspond à une quantité de tyrosine bien plus grande. Tel est le phéno-

mène contradictoire que nous ont offert, on s'en souvient, les expériences sur les milieux albuminoïdes : blanc d'œuf, lait, peptone pepsique. Rappelons que, pour cette dernière, nous avons dû conclure même à l'absence totale de tyrosine libre, d'après l'essai préliminaire avec le réactif des champignons, et que la culture n'y a pas moins donné lieu à l'apparition du pigment spécial. Nous ne nous résoudrons pourtant pas encore à abandonner la conclusion, qui découle par ailleurs d'expériences si décisives, que la tyrosine est indispensable à la production de ce pigment. Car la réaction positive avec le réactif de Millon subsiste, pour nous assurer que toute trace de tyrosine n'est pas absente de ces milieux. Mais encore une fois, c'est dans l'état où elle est méconnaissable pour la tyrosinase. Nous sommes donc amené à conclure que le microbe, pour faire son pigment identique à celui que donne la tyrosinase des champignons avec la tyrosine en nature, possède le pouvoir de réaliser préalablement cette dernière, à l'aide de ses éléments engagés dans la molécule albuminoïde. Les agents chimiques (alcalis, acides), capables d'une pareille transformation, nous enseignent qu'elle résulte simplement d'une fixation d'eau. L'équivalent biologique des agents chimiques doit être cherché où l'on sait le trouver d'ordinaire, c'est-à-dire parmi les diastases. Entre les diastases hydratantes connues, la trypsine fait subir cette même transformation à la molécule albuminoïde, au point d'accumuler, comme nous avons vu, la tyrosine dans le produit de la digestion pancréatique. Nous devons donc admettre l'existence de la trypsine dans le bacille pyocyanique de la nouvelle variété. Aussi bien, d'autres microbes ont déjà présenté ce ferment. Pouvons-nous constater dans les cultures, sinon le ferment lui-même, du moins son produit, la tyrosine, et cela, d'une façon plus immédiate que par le pigment qui en dérive sous l'action du microbe? Le lait seul permet cette recherche à l'aide de notre réactif habituel, car le lait, comme nous l'avons vu, ne se colore que faiblement par la diastase des champignons. Un essai comparatif du lait normal et du lait où le microbe cultive depuis quelque temps, mais n'a pas encore manifesté sa fonction mélanogène, m'a bien donné, en effet, une coloration plus foncée dans le produit de culture. Mais j'ai lieu de croire que la trypsine ne diffuse pas dans le liquide de culture, et que la pro-

duction, comme la transformation de la tyrosine, reste un phénomène intracellulaire.

***

Je dois maintenant prévenir la confusion de deux phénomènes distincts, qui pourrait résulter de la synonymie dans la désignation des couleurs qu'ils font apparaître, synonymie due elle-même à la pauvreté du vocabulaire dont nous disposons pour désigner les nuances. Ainsi, j'ai décrit autrefois une teinte rouge brun dans les vieilles cultures de bacille pyocyanique en peptone et en gélatine glucosée, et je l'ai attribuée au vieillissement d'un troisième pigment différent du vert florescent et de la pyocyanine. J'ai reproduit ce phénomène en parallèle avec le phénomène nouveau. La preuve que le rouge brun qui s'y montre n'a rien de commun avec la coloration analogue de la nouvelle variété pyocyanique, c'est qu'il est produit par le bacille pyocyanique ordinaire, incapable de transformer ainsi la tyrosine, et que, d'autre part, son milieu de prédilection est la gélatine où, faute de tyrosine, le bacille mélanogène lui-même ne produit pas son pigment spécial.

***

Ainsi la distinction est bien établie entre les deux bacilles pyocyaniques, l'ancien et le nouveau. Si l'on admet que le microbe doué de la plus grande complexité fontionnelle doit être pris pour le type normal de l'espèce, le nouveau bacille peut a bon droit revendiquer ce titre sur l'ancien. Celui-ci, sous ce point de vue, représenterait un descendant dégénéré du premier. Dans cette interprétation, remarquons à quel point il aurait perdu toute trace de cette fonction mélanogène, qui caractérise le type dont il serait descendu.

Mais on peut aussi penser qu'un germe du type pyocyanique le plus anciennement connu s'est trouvé dans des conditions particulièrement favorables à l'acquisition de la fonction nouvelle. Telles seraient les circonstances pathologiques[1] où le nouveau bacille s'est rencontré et où a pu s'exercer la faculté bien connue de l'organisme vivant de créer ou d'exalter les apti-

1. Radais, *loco citato ;* Charrin, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1897, p. 810.

titudes microbiennes. Cette vue se concilie mieux surtout avec la rareté du nouveau germe [1], comparée à la fréquence et à l'ubiquité de l'ancien.

III

CONCLUSIONS

Résumons les faits contenus dans ce travail. Un germe pyocyanique nous a montré une fonction chromogène nouvelle. Nous avons vu que le nouveau pigment dépendait de la présence de la tyrosine dans les milieux de culture. Son identité avec le pigment que donne la tyrosine sous l'influence de la tyrosinase nous a fait admettre l'existence de cette tyrosinase dans le microbe. Le microbe emploie une autre diastase, la trypsine, pour amener la tyrosine des matières albuminoïdes sous l'état où sa tyrosinase peut agir sur elle. Ainsi, le microbe atteint la tyrosine aussi bien combinée que libre, et par là est comparable au réactif de Millon. Peut-être même l'analogie se poursuit-elle dans le détail et peut-on concevoir, dans l'action du réactif de Millon lui-même, deux phases, l'une hydratante, qui dégage la tyrosine des matières albuminoïdes, l'autre oxydante, qui la rougit ; ce ne serait pas en contradiction, au moins, avec ce qu'on sait de la décomposition des matières albuminoïdes en milieu acide comme celui qu'offre le réactif azoto-mercurique, non plus qu'avec les conditions de temps et de température qu'on sait nécessaires pour que la coloration apparaisse avec ce réactif.

Nous pouvons dire encore : étant donnée une fonction d'un être vivant, dont on ne connaissait, avec son origine cellulaire et son aboutissant, que les produits complexes qui l'alimentent, l'étude expérimentale a révélé, dans ces produits, le principe chimique unique auquel la fonction s'adapte ; dans

1. Rareté qui peut être due aussi à ce que l'attention n'avait pas été appelée sur cette variété et qu'on n'était pas préparé à la reconnaître. M. Radais fut un long temps avant d'y constater le caractère spécifique, la production de pyocyanine. Cependant M. G. Thiry dit récemment avoir observé un germe de cette variété provenant d'une eau. (*Bacille polychrome et Actinomyces mordoré*, Paris, 1900, p. 76.)

l'être vivant, l'agent chimique par lequel elle s'exerce. Dans l'état actuel de la science, nous devons en demander autant pour les diverses fonctions. Peut-on entrevoir que les autres fonctions chromogènes du bacille pyocyanique seront ramenées à des termes aussi simples et, en particulier, rattachées à des actions diastasiques? Certains faits, sur lesquels ce n'est pas le lieu d'insister, me donnent à penser que de telles actions pourraient bien aussi entrer en jeu dans la production de ses autres pigments. En tout cas, la possibilité de l'association et de la coopération de diverses diastases, comme cette étude nous en a fourni un exemple, jointe à la notion récente[1] que des diastases peuvent faire aussi œuvre de synthèse, aide à concevoir que des actions diastasiques pourraient intervenir dans l'élaboration de produits aussi différenciés, même à partir des éléments chimiques les plus simples, comme ceux du milieu salin où nous voyons le bacille pyocyanique élaborer ses pigments habituels.

1. Hill, 1898.

RECHERCHES SUR L'ANTISPERMOTOXINE

PAR W. WEICHARDT

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les théories de MM. Bordet et Ehrlich-Morgenroth sur la nature et les lieux de production des différents poisons cellulaires ont inauguré une ère de recherches très fécondes en promesses pour l'avenir.

A la nouvelle orientation résultant de ces importantes recherches, nous devons, entre autres, la découverte du *diagnostic* médico-légal du *sang humain* et, dans la *sérothérapie*, un grand nombre de voies nouvelles.

Dans son important travail sur les *cytotoxines* [1], M. le professeur Metchnikoff conclut ainsi :

« MM. Roux, Borrel, Lesné et Widal ont démontré dans leurs travaux, exécutés avec une si parfaite technique, que le sang des urémiques et des éclamptiques n'est point, d'une manière spécifique, toxique pour les animaux, même si on le met en rapport avec les éléments nerveux. Il est évident qu'il y a dans ces maladies des poisons pour lesquels les cellules de l'individu même, ou des individus de la même espèce, ont des groupes *haptophores*. Il s'agit, suivant la nomenclature de M. Ehrlich, d'une production d'autotoxine ou d'isotoxine. »

M. Metchnikoff propose d'introduire les antitoxines spécifiques dans l'organisme de l'homme afin d'arriver à exercer une influence sur ses autotoxines.

Naturellement, il est nécessaire pour cela de produire chez une autre espèce animale des sérums antitoxiques, en leur injectant du sérum toxique.

Ces recherches pourront être couronnées de succès si l'on parvient à acquérir une connaissance spéciale des parties composantes des sérums de divers animaux et de leurs rapports réciproques.

La spermotoxine, découverte par MM. Landsteiner [2] et

1. *Revue générale des Sciences*, 1901, 15 janvier.
2. *Centralbl. f. Bakter*, 1899.

Metchnikoff[1], se prête à cette étude, parce que les spermatozoïdes extraits récemment d'un testicule, avec leur flagelle très mobile, permettent de constater facilement les influences des différentes toxines que l'on fait agir sur eux.

Dans nos recherches, nous avons produit d'abord chez des cobayes un sérum toxique pour les spermatozoïdes de lapin. Suivant la méthode inaugurée par le professeur Metchnikoff, les testicules, soigneusement débarrassés des traces de sang, sont coupés en petits morceaux, pilés dans un mortier avec une petite quantité d'eau physiologique, puis passés à travers un tamis métallique. On injecte l'émulsion ainsi obtenue à des cobayes.

Afin d'opérer toujours avec un sérum spermotoxique d'une force déterminée, nous avons cherché à régler les injections de spermatozoïdes à nos cobayes, de façon à avoir, à la fin de l'immunisation, un sérum pouvant immobiliser complètement, dans l'espace de trois minutes, les spermatozoïdes récemment extraits des testicules d'un lapin neuf.

Chez quelques cobayes, le sérum acquiert vite, après l'injection de doses relativement faibles, ce degré prononcé de toxicité. Les autres mettent plus de temps pour fabriquer de la spermotoxine de cette force; mais chez quelques individus, nous ne sommes jamais parvenu, malgré des injections répétées de fortes doses d'émulsion testiculaire de lapin, à produire une spermotoxine aussi active. Ces cobayes furent éliminés de nos expériences.

Nous savons, par les travaux des auteurs précédemment cités, qu'un sérum doit sa puissance toxique pour une espèce de cellules à deux substances :

1° Au complément (cytase) facile à détruire ;

2° A la substance intermédiaire, suivant la nomenclature de M. Ehrlich, sensibilisatrice selon M. Bordet.

En chauffant à 56°, on détruit le complément; il reste la substance intermédiaire, qui, seule, ne peut pas produire un effet toxique.

Il s'agissait de déterminer en premier lieu si, pour la substance intermédiaire de la spermotoxine produite chez les cobayes à la suite des injections mentionnées plus haut, le sérum

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 6.

des autres animaux peut fournir des compléments réactivants.

Voici comment je procédais : je chauffais le sérum spermotoxique pendant une heure à 56°, et j'ajoutais ensuite du sérum frais de l'animal que j'examinais.

Le sérum spermotoxique, chauffé, inactif, du cobaye, et le sérum complémentaire d'animal neuf étaient mélangés dans les proportions de 1/15 jusqu'à 1/20, Metchnikoff[1] ayant trouvé que la substance intermédiaire et le complément agissent au maximum dans ces proportions.

J'ai examiné le sérum de 8 cobayes neufs, de différentes tailles et de différents sexes : tous ces sérums se sont montrés capables de réactiver la spermotoxine chauffée, car si on faisait le mélange à la façon décrite plus haut, les spermatozoïdes étaient immobilisés exactement au bout du même temps qu'ils l'étaient par du sérum spermotoxique actif, témoin.

Mais l'espoir de trouver, chez tous les individus de la même espèce, des compléments qui réactiveraient toujours de la même manière les corps intermédiaires de la spermotoxine ne devait pas se justifier.

Ainsi, sur onze lapins que j'ai examinés, chez cinq seulement le sérum se montra capable de réactiver ma spermotoxine chauffée aussi bien que le faisait le sérum de cobaye neuf. Quant aux six autres lapins, leur sérum possédait un pouvoir complémentaire (cytasique) très peu prononcé; ainsi, dans quatre cas l'immobilisation des spermatozoïdes ne survint qu'au bout de 1 à 2 heures ; dans deux autres cas, les spermatozoïdes manifestèrent encore après vingt heures une mobilité aussi accentuée que dans le sérum de lapin seul.

Naturellement, sur ces préparations, déjà vieilles de vingt heures, les mouvements des flagelles étaient beaucoup plus lents et les spermatozoïdes étaient agglutinés.

Les sérums d'oie, de cheval et d'homme contiennent des compléments qui réactivent la spermotoxine chauffée en trois à cinq minutes.

Au contraire, le sérum de trois souris que j'ai examinées ne manifestait point d'action alexique avec la substance intermédiaire de la spermotoxine.

Les sérums neufs des animaux mentionnés, ajoutés seuls

1. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1900, n° 9.

à des spermatozoïdes, montraient une très faible action toxique, perceptible seulement après plusieurs heures.

Une spermotoxine naturelle assez forte a pu être constatée dans le sang de deux rats. Ici les spermatozoïdes étaient déjà complètement immobilisés après 20 minutes de séjour dans du sérum seul.

Le sang de pigeon s'est comporté dans 2 cas comme le sang des rats.

Une action encore plus toxique sur les spermatozoïdes appartient au sérum de chien. Dans ce sérum, après quinze minutes, on ne peut plus constater la moindre mobilité.

Quand on fait un mélange d'un de ces trois sérums neufs avec du sérum spermotoxique chauffé, dans la proportion de 20/1, on n'aperçoit aucune action. Et cependant ces sérums par eux-mêmes étaient très toxiques, car ils immobilisaient les spermatozoïdes, comme nous l'avons déjà dit, en 15 à 20 minutes.

Mais si le sérum neuf était ajouté en quantité suffisante à la spermotoxine, l'immobilisation des spermatozoïdes survenait en un temps extrêmement court.

La toxicité naturelle des sérums neufs vis-à-vis des spermatozoïdes n'était du reste pas constante. Par exemple, le sérum d'un troisième rat, comparé à celui des deux rats précédemment examinés, présenta une action toxique très faible vis-à-vis des spermatozoïdes.

Le sérum d'un cheval montrait bien la même action alexique que le sérum de l'animal déjà examiné, mais le second différait du premier en ce sens qu'il possédait une action toxique vis-à-vis des spermatozoïdes, qu'il immobilisait complètement en une heure.

J'ai trouvé aussi dans deux cas, chez le même individu, un pouvoir toxique variable. Par exemple, dans un cas, les spermatozoïdes, mis dans du sérum d'oie, étaient encore mobiles après vingt heures; or, le sérum du même animal, qui n'avait pas été traité, immobilisait un mois après les spermatozoïdes en dix minutes.

Dans le second cas, le sérum d'un homme réactivait la substance intermédiaire de ma spermotoxine avec une intensité remarquable. Huit semaines plus tard, dans le sérum de la même personne, on n'a plus pu constater la moindre action alexique.

II

SUBSTANCES ANTI-INTERMÉDIAIRES ET ANTICOMPLÉMENTS

Si l'on injecte à un lapin du sérum d'un cobaye, dont le sérum est toxique pour les spermatozoïdes de lapin, on peut, comme l'a démontré M. Metchnikoff, produire chez ce lapin une antispermotoxine, même si celui-ci a été préalablement châtré.

On pouvait se demander si cette antispermotoxine n'est pas autre chose qu'une anticytase, semblable à celle que l'on obtient par injection du sérum normal, ou bien s'il s'agit dans ce cas d'une véritable substance antisensibilisatrice ou anti-intermédiaire.

Pour résoudre cette question, j'ai injecté à des animaux de différentes espèces du sérum spermotoxique que j'ai déjà décrit. En même temps j'ai injecté à d'autres animaux, de même espèce, des doses égales de sérum de cobaye neuf.

J'ai commencé par des souris ; leur sérum est naturellement très faiblement spermotoxique et il est complètement incapable de réactiver une spermotoxine chauffée. J'ai injecté à deux souris du sérum spermotoxique, à deux autres du sérum de cobaye normal. Chaque souris recevait à chaque injection 2 c. c. de sérum ; les injections étaient pratiquées tous les cinq jours, et on en a fait quatre en tout.

Pour abréger, je désignerai les souris injectées avec du sérum spermotoxique avec la lettre A, et les témoins avec la lettre B. 14 jours après la première injection, l'action antispermotoxique des souris traitées était encore faible. Après le 21e jour, le pouvoir antispermotoxique était à son maximum. Le sérum recueilli à ce moment chez les animaux A et les animaux B fut mélangé avec une quantité égale de sérum toxique de cobaye, qui tuait les spermatozoïdes en 3 minutes. Une différence essentielle se manifesta déjà dès les premières minutes dans ces deux préparations. Dans le mélange du sérum A avec le sérum spermotoxique, les spermatozoïdes se montrent beaucoup plus mobiles que dans le mélange du sérum B avec

le sérum spermotoxique ; ce dernier tuait les spermatozoïdes des lapins en 3 minutes.

Après une heure de séjour dans le mélange A, beaucoup de spermatozoïdes se montraient encore mobiles, alors que le nombre de spermatozoïdes mobiles était infiniment plus faible dans le mélange B.

Après deux heures, tous les spermatozoïdes du mélange B étaient immobiles, tandis que dans le mélange A ils conservaient encore leur mobilité sur beaucoup de points.

Il me fut impossible de produire une antispermotoxine plus forte chez ces souris. Ainsi, malgré une cinquième injection que je leur ai faite le 30e jour après la première injection, le sérum des souris A pouvait retarder de 15 minutes l'action d'un sérum spermotoxique agissant en 2 minutes, les 2 sérums étant mélangés à parties égales. Le sérum des souris B, mélangé avec une quantité égale du même sérum spermotoxique, immobilisait complètement les spermatozoïdes dans 10 minutes.

Je voudrais aussi mentionner ce fait que l'antispermotoxine des souris A exerçait également une forte action sur la spermotoxine contenue naturellement dans le sérum de chien. Dans le sang du chien seul, les spermatozoïdes étaient immobilisés complètement après une demi-heure, mais ils se montraient encore très mobiles après une demi-heure dans un mélange contenant parties égales de sérum des souris injectées avec de la spermotoxine et du sérum de chien.

Chez des pigeons et des rats, je n'ai pas réussi à produire des antispermotoxines aussi actives. J'ai fait à un pigeon et à un rat, dans l'espace de quinze jours, trois injections de 2 c. c. de sérum spermotoxique, puis à deux témoins — pigeon et rat — j'ai injecté autant de sérum de cobaye normal.

Le sérum de ces quatre animaux manifestait à lui seul, au commencement de mes recherches, une assez forte action toxique sur les spermatozoïdes. Après 15 à 20 minutes, ceux-ci étaient déjà complètement immobilisés. Le pigeon A, traité avec du sérum spermotoxique, donna après 14 jours un sérum qui, mélangé avec une quantité égale de sérum spermotoxique, retardait l'action de ce dernier de 27 minutes. Le sérum spermotoxique de cobaye, que j'employais pour cette recherche, immobilisait les spermatozoïdes en 5 minutes. Le

sérum du pigeon qui me servait de témoin, qui a reçu la même quantité de sérum d'un cobaye normal, était seulement en état de retarder de 10 minutes l'action du même sérum toxique.

Chez les rats, j'ai cru constater un effet antitoxique, pouvant retarder de 2 minutes seulement l'action du sérum spermotoxique; mais je n'ai pu constater ce retard que pour le sérum du rat, auquel j'avais injecté du sérum spermotoxique. Le rat témoin, injecté avec du sérum de cobaye normal, ne paraissait pas exercer une action antitoxique.

J'ai pu constater également ce fait curieux, que, à la suite des injections faites aux rats et aux pigeons, leur sérum, employé seul, diminua fortement de toxicité vis-à-vis des spermatozoïdes de lapin, 15 jours après.

De même, les sérums qui, avant l'injection, pouvaient immobiliser les spermatozoïdes complètement en 15 à 20 minutes, ne parvenaient au même résultat, après les injections, qu'au bout de 1 heure ou 1 heure et demie.

Mais les pigeons ont fait exception à cette règle, car dans le sérum du pigeon injecté avec de la spermotoxine, les spermatozoïdes restaient mobiles encore pendant un temps plus long que dans celui du pigeon injecté avec du sérum de cobaye.

J'ai réussi à obtenir la plus forte antispermotoxine chez un lapin châtré qui avait reçu en 14 jours 3 injections, à raison de 5 c. c. de sérum spermotoxique par injection. Un lapin témoin, également châtré, a reçu en même temps la même quantité de sérum d'un cobaye neuf. J'ai pris pour cette expérience 2 lapins dont le sérum était capable de réactiver complètement et rapidement la spermotoxine chauffée à 55°.

Le mélange de sérum de lapin neuf avec de la spermotoxine chauffée, fait dans la proportion de 15/1, immobilise les spermatozoïdes avec la même intensité et aussi rapidement que le sérum spermotoxique seul, non chauffé.

J'ajouterai qu'on ne pouvait pas constater la moindre action spermotoxique dans les sérums seuls de ces deux lapins.

Après le traitement, le lapin injecté avec du sérum spermotoxique fournit une antispermotoxine qui annulait presque complètement les effets de la spermotoxine; car, si l'on mélangeait le sérum de ce lapin avec la même quantité de sérum d'un

cobaye, tuant les spermatozoïdes de lapin en 3 minutes, ceux-ci restaient encore, après 4 heures, mobiles, dans plusieurs parties de la préparation.

Dans le sérum de l'animal témoin, qui n'était pas chauffé, on ne pouvait apercevoir aucune action antispermotoxique; mais si l'on chauffait ce sérum témoin, les spermatozoïdes restaient une heure encore mobiles dans le mélange avec la même quantité de sérum toxique de cobaye. En même temps on pouvait reconnaître que les sérums des 2 lapins avaient perdu, après les injections, une grande partie de l'action complémentaire qu'ils possédaient auparavant, vis-à-vis du sérum spermotoxique inactivé de cobaye.

Dans ce mélange, les spermatozoïdes perdaient complètement leur mobilité dans l'espace de 1 heure et demie à 2 heures; tandis que, avant les injections, ils perdaient leurs mouvements déjà au bout de 2 à 3 minutes, dans le mélange d'une même quantité de sérum spermotoxique avec du sérum de 2 lapins normaux.

Pour trouver une preuve directe que dans le sérum d'un lapin, auquel on injecte du sérum spermotoxique, il se forme aussi une substance anti-intermédiaire, je fis l'expérience suivante.

Comme nous l'avons fait précédemment, nous désignerons par la lettre A, le sérum de l'animal injecté avec le sérum spermotoxique de cobaye, et avec la lettre B le sérum de l'animal injecté avec du sérum de cobaye non traité.

Les sérums des 2 lapins inactivés furent mélangés chacun avec la même quantité de sérum spermotoxique, aussi inactivé, d'un cobaye, qui auparavant, à l'état normal, immobilisait dans 3 minutes les spermatozoïdes de lapin.

A chacun de ces deux mélanges, j'ajoutais une même quantité de spermatozoïdes d'un lapin neuf, et, comme complément, dans un cas, j'ajoutai aussi une grande quantité de sérum d'un troisième lapin neuf, dont j'avais observé la parfaite action complémentaire avec du sérum spermotoxique inactivé de cobaye.

Au mélange des sérums inactivés, j'ajoutai, dans le deuxième cas comme complément, des sérums nouveaux d'autres espèces d'animaux, d'un cheval et d'une oie, qui possédaient aussi un fort pouvoir complémentaire.

Dans le mélange avec le sérum A, la mobilité des spermatozoïdes du lapin était encore assez bien conservée après 2 heures ; dans le mélange avec le sérum B, ils avaient déjà perdu toute trace de mobilité en 5 minutes. Les sérums d'un cheval ou d'une oie qui étaient à ma disposition, comme complément, pendant cette dernière expérience, étudiés pour leur action toxique et agglutinante à l'égard des spermatozoïdes, les immobilisaient complètement dans l'espace de 40 à 60 minutes.

C'est pourquoi je ne pouvais pas constater, entre les deux mélanges des sérums A et B, une différence de temps aussi grande que lorsque j'employais le complément de lapin; mais j'ai vu cependant, après 20 minutes, dans le mélange A, une remarquable mobilité des spermatozoïdes, tandis que dans le mélange B, la mobilité avait complètement cessé au bout de 15 à 20 minutes.

Si l'on prenait le sérum d'oie au lieu de sérum de cheval, on pouvait toujours trouver le même rapport.

III

ANTI-AGGLUTININE ET ANTISUBSTANCE INTERMÉDIAIRE

Je voudrais mentionner encore un fait qui s'est produit, surtout, dans les mélanges avec les sérums des deux lapins A et B.

Le sérum des cobayes rendus spermotoxiques avait à l'égard des spermatozoïdes du lapin non seulement une toxicité assez forte, empêchant leurs mouvements et les immobilisant d'une façon complète au bout de trois minutes, mais, en plus, son action était aussi extrêmement agglutinante.

Lorsque nous ajoutâmes à ce sérum du sérum du lapin B, les spermatozoïdes s'agglutinèrent d'abord, puis ils s'immobilisèrent en masse ; mais si nous ajoutions, au même sérum toxique et agglutinant du cobaye, du sérum de lapin A, il devenait impossible d'observer la moindre trace d'agglutination ,

et lorsque les spermatozoïdes furent enfin immobilisés par la spermotoxine, ils ne se sont pas agglutinés.

Il est évident que, dans le sérum de lapin, il s'était formé, à côté de la substance intermédiaire, une anti-agglutinine qui était en état d'avoir raison des actions réunies de la substance anti-intermédiaire et de l'anticomplément

Ce parallélisme évident entre l'anti-agglutinine et la substance intermédiaire. on le pouvait observer dans toutes les préparations, sans exception. Ces anti-agglutinines, formées parallèlement avec les substances intermédiaires, n'avaient, du reste, aucune influence sur les agglutinines qui se trouvaient dans les sérums naturellement toxiques de l'oie et du cheval mentionnés plus haut.

Dans toutes les préparations dans lesquelles il s'agissait d'un mélange de deux différentes espèces de sérum, on pouvait observer, dans un temps plus ou moins court, la formation de sédiments granuleux d'albumine, surtout si on ajoutait, au sérum de l'animal traité, du sérum avec lequel cet animal avait été injecté pour produire les substances anti-intermédiaires et les anticompléments.

CONCLUSIONS

De l'ensemble des faits rapportés plus haut se dégage cette conclusion que, à la suite d'immunisation des animaux avec du sérum spermotoxique, il se forme chez ces derniers une substance anti-intermédiaire (antifixatrice).

En terminant, je tiens à témoigner à M. le professeur Metchnikoff toute ma gratitude pour son bienveillant concours pendant toute la durée de mon travail.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'AUTO-PURIFICATION MICROBIENNE DU VAGIN
Expériences sur les animaux.

PAR LE Dr CAHANESCO (DE BOTUSANI).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Sous le nom d'autopurification (Selbstreinigung) microbienne du vagin, MM. *Menge* et *Krönig*[1] désignent l'intéressant phénomène qu'ils ont observé chez la femme, à savoir que le vagin — même dans l'état normal, c'est-à-dire non puerpéral — peut se débarrasser des microbes qui y sont arrivés soit accidentellement, soit expérimentalement. Ce phénomène serait dû, soit à l'antagonisme des microbes autochtones avec les microbes pathogènes qui sont introduits, soit à l'acidité du mucus vaginal de la femme, acidité due à la présence de l'acide lactique, qui n'est à son tour qu'un produit de ces mêmes microbes autochtones. Autrement dit, le mucus vaginal serait un milieu favorable pour certains microbes qui se trouveraient habituellement dans le mucus « normal » (Doederlein), et ces microbes lutteraient à leur tour contre les microbes pathogènes qui pourraient y arriver accidentellement.

Il était intéressant de voir si un phénomène analogue se produisait aussi chez les animaux. C'était le but du travail qui nous fut d'ailleurs recommandé par notre cher et illustre maître, le professeur *Metchnikoff*. Il s'agissait donc de savoir : (*a*) Existe-t-il chez les animaux un phénomène analogue d'autopurification microbienne ? Et en cas affirmatif : (*b*) A quoi ce phénomène est-il dû, à un antagonisme microbien ou à autre chose?

Les expériences analogues sur les animaux ont déjà été faites par *Stroganoff*[2], mais dans les traductions allemandes et

1. MENGE et KRONIG, *Bactériologie des weiblichen Geschlechtskanales.*

2. STROGANOFF, *Recherches bactériologiques sur le canal génital de la femme dans les diverses périodes de la vie*, 1893. — STROGANOFF, Zur Bacteriologie des weibl. Geschlechtskanales, *Centralblatt für Gynekologie*, 26 septembre 1895.

françaises, nous n'avons pu trouver ni les méthodes employées, ni les résultats précis auxquels il était arrivé. Aussi étions-nous obligé de recommencer de toutes pièces ces expériences, guidé par le très remarquable travail de Menge et Krönig.

Les animaux sur lesquels nous avons fait nos expériences ont été : la chienne, le cobaye, la lapine, et, pour avoir une plus grande quantité de mucus vaginal, nous nous sommes servi d'une jument en chasse.

Les microbes que nous avons employés pour l'expérimentation étaient les suivants : *Micrococcus prodigiosus*, *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Streptococcus pyogenes et Bacillus pyocyaneus*, soit séparément, soit simultanément.

Nous tâchions d'employer autant que possible les microbes que nous n'avions pas trouvés, par nos recherches préalables, dans la flore microbienne du mucus vaginal de l'animal soumis à l'expérimentation — tout en donnant la plus grande importance au staphylocoque et au streptocoque, qui sont les microbes qui nous intéressent le plus.

Pour cultiver les microbes trouvés dans le mucus vaginal, nous nous sommes servi des méthodes courantes pour les aérobies et des milieux habituels : bouillon, gélose, gélatine, pommes de terre. Pour les anaérobies, nous avons adopté la méthode employée par MM. Veillon et Zuber.

Il va sans dire que nous ne nous sommes pas occupé d'isoler tous les microbes trouvés à l'intérieur des organes génitaux des différents animaux de l'expérience. Ce n'était pas notre but et cela nous aurait mené trop loin. Mais nous nous sommes toujours appliqué à isoler les microbes que nous avons trouvés *constamment* à différentes reprises sur le même animal, et surtout sur la même espèce animale, car seuls ceux-ci auraient pu jouer un certain rôle en cas d'antagonisme (à l'instar du bacille de Doederlein chez la femme).

Pour les anaérobies, la méthode Veillon paraît être la meilleure de toutes que nous connaissons jusqu'ici. Elle a seulement l'inconvénient de demander trop de matériel et trop de temps, et ne saurait être employée que pour les cas où la recherche des anaérobies est le but principal, et non pas, comme dans notre cas, d'une importance secondaire.

Pour l'inoculation des microbes dans le vagin, nous nous sommes servi de différentes méthodes. Au commencement nous injections 1 c. c. d'une culture de 24 heures dans du bouillon, à l'aide d'une seringue de Pravaz munie d'un petit tube à bords mousses, pour ne pas léser la paroi vaginale. Cette méthode s'est montrée défectueuse, car assez souvent l'animal évacuait la presque totalité du liquide inoculé, soit par des contractions des muscles du vagin, soit par des mouvements du corps.

Nous avons plus tard adopté une autre méthode qui nous paraissait meilleure : à savoir, le badigeonnage de la muqueuse avec de la culture faite sur plaques, à l'aide d'un pinceau stérilisé dans un peu d'eau, afin que les poils restent doux, pinceau qui fut introduit à travers un spéculum en verre stérilisé.

Pour isoler les microbes du mucus, nous lavions dans du bouillon stérilisé le pinceau chargé de ce mucus, puis nous l'essuyions sur une série des tubes inclinés de gélose, gélatine ou pomme de terre. Pour les anaérobies, une goutte du premier bouillon fut diluée dans une série des tubes Liborius.

A chaque expérience nous avons pris le soin de noter la réaction du mucus vaginal. Les préparations microscopiques faites aussi à l'aide des pinceaux stériles furent fixées avec éther et alcool, et colorées, soit à la thionine, soit au Gram-eosin ou Gram et hématéine.

Pour savoir si le mucus vaginal, comme tel, est en état de tuer ou d'empêcher la végétation des microbes, nous avons agi de la façon suivante : chez les petits animaux qui ne pouvaient pas nous procurer une grande quantité de mucus, nous essuyions leurs parois vaginales à l'aide du pinceau ; puis, avec le pinceau chargé de mucus, nous badigeonnions les plaques de culture, et sur ces plaques nous avons ensemencé les microbes de l'expérience.

Toujours ils ont bien poussé en même temps que les microbes qui se trouvaient déjà dans ce mucus. Plus tard, comme nous avons eu l'occasion de trouver une jument en chasse qui pouvait nous procurer une plus grande quantité de mucus vaginal, nous nous en sommes servi pour les expériences 15-16.

Pour étudier l'antagonisme microbien — *in vitro* — nous avons ensemencé les microbes isolés — surtout ceux qui se trouvaient régulièrement dans le vagin des animaux. Nous les avons

ensemencés en même temps que les microbes de l'expérience sur divers milieux de culture.

Après ce court exposé des méthodes employées, qu'il nous soit permis de donner les résultats auxquels nous sommes arrivés. Ces résultats ne sont pas tout à fait identiques avec ceux trouvés par Menge et Krönig chez la femme.

Les voici :

1. Dans le vagin des femelles se produit un phénomène analogue à celui trouvé par Menge et Krönig, Stroganoff, chez la femme, c'est-à-dire un certain degré *d'autopurification microbienne*. Cette autopurification est relativement faible, diffère d'animal à animal, de microbe à microbe.

2. Elle est le résultat de différents phénomènes : *le sens du courant de la sécrétion* dirigé vers l'entrée du vagin, une *desquammation épithéliale* continuelle. Par ces deux moyens les microbes sont entraînés mécaniquement vers la vulve et vers l'extérieur ; mais surtout c'est *l'action des leucocytes*. Ces derniers agissent et comme *phagocytes*, et peut-être aussi par des substances toxiques qu'ils élaborent à l'intérieur du vagin.

Le vagin répond toujours, par une leucocytose plus ou moins forte, à l'introduction des microbes. Ces leucocytes viennent directement à travers la paroi vaginale, ce que l'on peut observer sur les coupes faites quelques heures après l'introduction des microbes. Elle peut aboutir à l'anéantissement total de ceux-ci ; souvent cependant cette disparition complète n'est *qu'apparente*, c'est-à-dire que dans les premières heures ou les premiers jours, le nombre des microbes diminue considérablement : sur les préparations on n'en trouve que peu ou pas du tout ; de même sur les milieux de culture ne poussent que peu de colonies ; mais si on examine l'animal, 8 ou 10 jours après, on retrouve les microbes inoculés qui paraissaient disparus, et dorénavant ils peuvent constituer une partie constante de la flore microbienne du vagin. Ceci est vrai surtout pour les microbes pyogènes, staphylococcus et streptococcus.

En somme, cette disparition dans les premières heures ou les premiers jours après l'expérience *peut* être complète ou le *paraître*, et, dans ce dernier cas, les microbes restés vivants constituent des parasites permanents du vagin.

De tous les microbes que nous avons inoculés, le *prodigiosus*

disparaissait le plus tôt et nous ne pouvions plus le retrouver; il paraît qu'en effet le mucus vaginal *frais* a une certaine influence sur la vitalité de ce microbe (voir expérience 15).

3. Quoique, comme nous l'avons déjà dit, notre but principal ne fût pas la recherche des microbes du vagin chez les animaux, nous avons pu pourtant nous convaincre, par différentes prises faites, que chez les animaux comme chez la femme la quantité des microbes et d'espèces microbiennes est de beaucoup plus grande à l'entrée du vagin que dans la profondeur. Cependant nous n'avons jamais trouvé stériles les culs-de-sac vaginaux. Le mucus de la profondeur contenait, en même temps que divers microbes, des leucocytes peu nombreux et des cellules épithéliales.

4. Nous n'avons pu trouver — *in vitro* — aucun antagonisme des microbes isolés du vagin avec ceux que nous avons introduits expérimentalement. De même, dans les préparations microscopiques, nous n'avons pas pu constater la prédominance d'une espèce microbienne sur les autres.

5. Le mucus vaginal chez la jument, comme tel, ne s'est pas montré microbicide.

6. La réaction du mucus vaginal chez les animaux de l'expérience était toujours alcaline.

Comme on le voit, ces résultats diffèrent en quelque sorte de ceux trouvés chez la femme par les auteurs cités. Ils nous

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition définitive des microbes introduits.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+ la première plaque, colonies innombrables de différents microbes.	+ à peu près exclusivement colonies de staphylocoque doré.	Cellules épithélial. en grand nombre, dont les unes couvertes de microbes : diplococcus (107) diplococcus géant (108), diplobacillus. Petits amas extracellulaires. Parci par-là un leucocyte polynucléaire.	Immédiatement après l'inoculation, à peu près exclusivement le coccus introduit. Cellules épithéliales. Peu de leucocytes. *3 heures après.* Même aspect. Phagocytes peu nombreux.	∞

engagent à recommencer les mêmes expériences chez la femme, ce qui sera le but d'un second travail.

Expérience I. — *Chienne* à laquelle nous avons introduit dans le vagin 1 c. c. d'une culture de 24 heures de *Staphylococcus aureus*, le 13 février 1901 (voir le détail p. 846).

Observations. — La flore bactérienne préexistante reste la même après l'introduction du staphylocoque ; celui-ci ne se trouvait pas antérieurement dans le vagin de cet animal.

40 *heures* après, les colonies du streptococcus autochtone paraissent prédominer sur celle du staphylocoque doré. Le nombre des colonies de ce dernier a sensiblement diminué. Cette diminution est progressive jusqu'au 18 février (5 jours après). Ce jour, la prise donne un nombre de colonies staphylococciques sensiblement augmenté. Dès ce moment je trouve toujours des colonies du staphylococcus aureus.

Le 23 février, je fais une injection dans le péritoine d'un cobaye avec le staphylocoque doré, isolé du mucus vaginal de cette chienne le 20 février. Le cobaye meurt et nous trouvons dans la sérosité péritonéale (l'autopsie fut faite 6 heures après la mort) un mélange de b. coli et staphylocoque doré. Nous répétons le 16 mars la même expérience sur un lapin qui est mort de staphylococcie. Nous en déduisons que la virulence n'est pas diminuée à l'intérieur du vagin.

Expérience II. — Chienne à laquelle nous avons inoculé 1 c. c. d'une culture pure de *Bacillus prodigiosus* le 24 février 1901.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition complète et définitive.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+ Colonies innombrables sur la première plaque.	+ Présence à peu près exclusive du prodigiosus.	Grand nombre de cellules épithéliales. Peu de microbes, dont la plupart petit diplococcus (107). Grand diplococcus (108). Par-ci par-là petits amas de coccus et de bacilles en dehors des cellules. Peu de phagocytose.	Immédiatement après, présence à peu près exclusive du bacille injecté. Le 1er mars (5 jours après) forte leucocytose. Peu de microbes, dont la plupart staphylococcus.	140 heures après l'inoculation.

Observations. — La flore vaginale reste la même avant et après l'inoculation. Nous avons isolé les microbes trouvés et nous les avons mêlés avec le prodigiosus dans différents milieux : bouillon, gélose, pomme de terre. Toujours ils se sont bien développés et n'ont pas empêché le développement du prodigiosus. Nous n'avons donc pas trouvé — *in vitro* — un antagonisme microbien.

Expérience III. — Chienne chez laquelle, après avoir constaté la disparition du B. prodigiosus inoculé le 24 février, nous avons de nouveau introduit le 5 mars 1 c. c. de culture du même microbe.

Réaction amphotère les 5 et 6 mars. Les jours suivants toujours alcaline.

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition totale et complète.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+ Exclusivement prodigiosus.	Forte leucocytose. Phagocytes englobant des cocci et peu de bacilles. Très peu de microbes extra-cellulaires.	Immédiatement après, gr. nombre de microbes inoculés. 24 *heures apr.* leucocytose. Cellules épithéliales, phagocytose. Grand nombre de microbes[1] très divers extra-cellulaires. Le 7/III. Le nombre des microbes fortement diminué.	96 *heures après.*

Expérience IV. — *Cobaye A*, dans le vagin de laquelle on a introduit 1 c. c. de culture dans bouillon de *B. prodigiosus* le 21 *mars.*

Réaction alcaline.

1. En retirant le pinceau nous avons touché l'entrée du vagin, ce qui explique le grand nombre de microbes trouvés dans la préparation.

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+ Peu de microbes.	Grand nombre de microbes surtout un petit bacille extra-cellulaire. Coccus en amas et en courtes chaînettes. Leucocytose. Phagocytose. Cellules épithéliales assez nombreuses couvertes de microbes.	Même aspect qu'auparavant.	30 *heures après.*

Observations. — La culture fut expulsée en plus grande partie. La flore bactérienne ne diffère pas beaucoup avant et après l'expérience. 30 heures après nous ne trouvons plus de prodigiosus. Les préparations montrent : leucocytose, peu de microbes, par-ci par-là un diplococcus. Peu de phagocytes. Grand nombre de cellules épithéliales.

Expérience V. — *Cobaye B.* — Dans le vagin de laquelle nous avons introduit 1 c. c. d'une culture de *Streptococcus pyogenes.*

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES	
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS
+	+ Streptococcus en grand nombre.	Leucocytose. Peu de microbes.	Une heure après l'inoculation, forte leucocytose, forte phagocytose. Les phagocytes sont bourrés de coccus. Trois heures après, le streptococcus se trouve à peu près exclusivement à l'intérieur des phagocytes. Nous tuons l'animal pour faire des coupes.

Observation. — Femelle au commencement de la grossesse. Dans les préparations, infiltration leucocytaire de la paroi vaginale.

Expérience VI. — *Cobaye C.* — Badigeonnage de la muqueuse vaginale au moyen d'un pinceau chargé d'une culture pure de *Streptococcus pyogenes* le 28 mai 1901.

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT dans différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+ Surtout streptococcus.	Peu de cellules épithéliales, leucocytes. Peu de bactéries, surtout un bacille court qui ne prend pas le Gram. Pas de phagocytose.	30′ après. Forte leucocytose. Phagocytose très active, 1 h après. Le nombre de microbes en dehors des cellules est très diminué.	∞ Le streptococcus reste comme hôte stationnaire à l'intérieur du vagin et nous le retrouvons 8, 10, 15 jours après.

Expérience VII. — *Cobaye D.* — Inoculation du *Streptococcus pyogenes.*

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT dans différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Peu de microbes, surtout bacilles. Leucocytes polynucléaires. Pas de phagocytose. Cellules épithéliales peu nombreuses.	1 heure après l'inoculation grand nombre de cellules épithéliales. Présence à peu près exclusive du streptococcus pyogènes. Pas de leucocytes. On peut constater un certain groupement des microbes semblable à une agglutination.	∞

2 *heures après l'inoculation*. hyperleucocytose. Phagocytose très intense. Peu de microbes en dehors des cellules. Les cellules elles-mêmes sont pleines de streptocoques. Pas d'autres microbes dans le champ visuel.

4 *heures après*, même aspect.

24 *heures après*, leucocytose. Relativement peu de phagocytes. Peu de microbes. Présence d'un bacille fusiforme.

48 *heures après*, les préparations microscopiques montrent peu de microbes, mais les plaques ensemencées nous donnent encore des colonies peu nombreuses de streptocoques.

8 *jours après*, nous sommes surpris de la grande quantité de streptococcus que nous trouvons et dans les préparations et sur les plaques ensemencées. L'animal se porte bien.

Dorénavant nous trouvons constamment les streptocoques à l intérieur du vagin de cet animal, le mucus vaginal reste trouble et riche en leucocytes..

Expérience VIII. — *Lapine* à laquelle nous avons injecté une culture pure de *Streptococcus pyogenes*, le 10 *avril* 1901. Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+ Peu de microbes.	+ streptococcus.	Cellules épithéliales. Leucocytes. Microbes peu nombreux.	3 heures après l'inoculation, forte leucocytose. Peu de phagocytose. Même aspect le lendemain.	8 jours après nous retrouvons le streptocoque que nous n'avions pas trouvé avant l'inoculation.

Observation. — Le lapin ne se prête pas très bien à ces expériences à cause de sa contention difficile. Aussi nous avons renoncé et nous avons recommencé nos expériences sur les cobayes.

Expérience IX. — *Cobaye* 82. — Badigeonnage de la muqueuse avec une culture pure de *Bacillus pyocyaneus;* une heure après nouveau badigeonnage avec une culture de *staphylococcus*, le 19 février 1901.

Réaction alcaline.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Sécrétion abondante fluor. Sous le microscope, grand nombre de microbes dont les uns prennent le Gram, les autres se décolorent. Un bacille fusiforme se colorait seulement aux bouts. Forte leucocytose. Phagocytose. Grand nombre de cellules épithéliales.	Immédiatement après, le champ visuel est couvert du bacille inoculé. 1 heure après, les bacilles sont groupés en petits amas agglutinés. Leucocytose. Peu de phagocytes. Nous inoculons le streptococcus.	∞

2 *heures après*, même aspect, en plus le staphylococcus en grand nombre et présentant le même groupement que le pyocyaneus.

4 *heures après*, même aspect. Phagocytose plus prononcée. Nous examinons chaque jour jusqu'au 29 avril le mucus vaginal et nous retrouvons toujours le *pyocyaneus* et le *staphylococcus* en assez grande quantité. Les autres microbes que nous y avons trouvés restent dans le même état. L'animal se porte bien. C'est seulement le 12 mai que nous ne retrouvons plus le *pyocyaneus*, pendant que le *staphylococcus* s'y trouve toujours. A cette date nous avons tué l'animal.

Expérience X. — *Cobaye* 97, badigeonnage de la muqueuse avec culture prise de *Bacillus pyocyaneus*, le 12 avril 1901.

Réaction alcaline.

Observation. — La leucocytose persiste en même temps que l'on trouve d'autres microbes et le pyocyanique 8-10 jours après. Après le dixième jour, nous n'avons plus examiné l'animal jusqu'au 23 mai, c'est-à-dire plus d'un mois, date à laquelle nous avons soumis le même animal à une autre expérience (voir expér. 14).

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Cellules épithéliales peu nombreuses, microbes peu nombreux, leucocytes en petit nombre.	Immédiatement après, le champ visuel est couvert par le b. pyocyaneus, peu de leucocytes. *3 heures après* forte leucocytose, phagocytose relativem. peu accentuée. *24 heures après*, le nombre des microbes est de beaucoup diminué, leucocytose.	∞

Nous avons trouvé quelques colonies du pyocyanique, ce qui démontre combien cette autopurification est lente.

Expérience XI. — Cobaye 59, auquel nous avons introduit le 24 avril une culture prise de *Staphylococcus pyogenes aureus*.

Réaction alcaline.

ENSEMENCEMENT sur divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES	
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS
+ Entre autres microbes aussi peu de colonies de staphylococcus pyogenes aureus.	— A peu près exclusivement staphylocoque doré.	Pas de microbes dans les préparations. Très peu de leucocytes. Cellules épithéliales.	3 heures après l'inoculation, nous trouvons une forte leucocytose et phagocytose. 24 heures, leucocytose. Peu de phagocytes. 3 jours après, forte desquamation épithéliale. Leucocytose. Peu de phagocytes. Microbes peu nombreux, mais toujours la présence de staphylococcus aureus, qui ne montre pas de tendance à disparaître.

Expérience XII. — *Cobaye* 67. Introduction du staphylococcus, 24 avril. Les phénomènes sont les mêmes que pour 59.

Expérience XIII. — *Cobaye* 23, auquel nous avons inoculé le 22 une culture de *prodigiosus*.

RÉSULTATS DE L'ENSEMENCEMENT dans divers milieux.		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Leucocytose, peu de cellules épithéliales, très peu de microbes parmi lesquels un diplococcobacille qui se décolore par le Gram.	Même aspect qu'avant, en plus le B. prodigiosus. 52 heures après, cellules épithéliales. Forte leucocytose. Phagocytose. Microbes en quantité assez notable.	52 heures après.

Expérience XIV. — *Cobaye* 97, dont nous avons badigeonné la partie vaginale avec une culture prise de *B. prodigiosus*.

RÉSULTAT DE L'ENSEMENCEMENT sur différents milieux		PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES		DATE de la disparition.
AVANT	APRÈS	AVANT	APRÈS	
+	+	Cellules épithéliales. Leucocytes. Peu de phagocytose Microbes assez nombreux, surtout bacilles. Peu de coccus.	1 heure après : B. prodigiosus très nombreux. Coccus, bacilles. 24 heures après. Prodigiosus peu nombreux. Présence d'autres microbes. Coccus, bacilles, chaînettes de streptocoques.	5 heures après.

Expérience XV-XVI. — Sur une jument en chasse nous faisons une prise de mucus vaginal à l'aide d'un spéculum en verre que nous introduisons assez profondément. Nous pouvons retirer un peu plus d'un centimètre cube d'un mucus légèrement trouble. Ce mucus est introduit dans un tube stérile et nous sert comme milieu de culture pour le bacillus prodigiosus, et

pour le bacillus pyocyaneus. La réaction est nettement alcaline.

A l'examen microscopique, nous trouvons :

Cellules épithéliales. Leucocytes assez nombreux. Quantité de cils provenant probablement des cellules utérines, microbes, surtout chaînettes assez longues, streptococciques, et un bacille qui se décolore par le Gram (Coli?). Petits amas staphylococciques.

Le mucus ensemencé avec les microbes susdits fut mis à l'étuve à 38°. Nous faisons de temps en temps une prise et nous l'ensemençons dans les milieux ordinaires. Les prises faites après 2, 4, 24, 48 et 72 heures ont bien poussé. La seule remarque que nous ayons faite, c'est que le *prodigiosus* des premières 24 heures est resté incolore. Toujours est-il que le mucus n'a tué ni le *prodigiosus*, ni le *pyocyaneus*, *in vitro*. Les autres microbes, et notamment le *staphylococcus albus* qui se trouvait dans le mucus, ont également poussé.

Dans le vagin d'une chienne nous avons trouvé de même :

1 (108). *Un diplococcus géant*, à très grands éléments, se colorant bien par les couleurs anilinées et le Gram, légèrement mobile, se développe vite à 20° sur gélose, en colonies opaques jaunâtres avec une légère teinte brunâtre : ne liquéfie pas la gélatine. Ensemencé en piqûre dans la gélatine, ne se développe qu'à la surface. Le bouillon reste clair. La culture injectée dans le péritoine d'une souris ne la tue pas.

Ce diplococcus nous a beaucoup intéressé parce que nous le trouvions constamment dans le mucus vaginal de cette chienne, mais ses cultures faites simultanément avec le *prodigiosus*, le *staphylococcus*, le *pyocyaneus*, ont poussé et n'ont empêché le développement de ces derniers dans aucun des milieux.

2 (107). *Streptococcus pyogenes*, qui apparaissait dans le mucus vaginal presque toujours sous forme de diplococcus.

3. *Staphylococcus pyogenes albus*, toujours et en grand nombre.

4. *Staphylococcus citreus* et *roseus*.

6. *Bacillus subtilis* en très grand nombre à l'entrée du vagin, peu nombreux à la profondeur, mais toujours présent.

7. *Bacillus coli communis*, presque toujours.

8. *Un diplococcobacille*, qui ne prend pas le Gram, ne liquéfie pas la gélatine, ne produit pas de gaz dans le milieu sucré, ne

donne pas la réaction de l'indol. Antagonismes comme 108.

9 à 12. *Sarcina orangea* deux fois. *Filaments d'un champignon. Aspergilus fumigatus* 1 fois. *Une levure.*

13. *Anaérobies* (1). Un bacille long, gros, mobile, liquéfiant la gélose sucrée et produisant une forte acidité dans ce milieu. Il se développe dans les premières 24 heures à 40°. Colonies petites, à peine visibles, entourées d'une petite bulle de gaz. Au fond du tube, ces colonies forment un voile qui nage sur le liquide fortement acide. Gram négatif. Tue la souris. Je ne l'ai trouvé qu'au commencement de mes recherches.

2. Petit *micrococcus* se développant dans les 48 heures, formant de toutes petites colonies blanches opaques, sans production de gaz. Gram négatif. Je l'ai trouvé plus souvent que le premier.

3. Un *streptococcus* à grands grains et longues chaînettes de 20-30 et plus encore. Gram; non pathogène pour le lapin. Se développe très mal sur les milieux aérobies.

Nous n'avons pas trouvé le staphylocoque doré et il paraît que, dans le vagin des animaux, le St. blanc est de beaucoup plus fréquent. Mais après l'introduction expérimentale du staphylocoque doré, nous le trouvions régulièrement.

Microbes trouvés chez le cobaye. — 1. Bacille petit apparaissant surtout comme diplobacille. Gram; se développe très bien dans le milieu de Veillon, en produisant des colonies blanches. opaques, lenticulaires. Aérobie facultatif. Non pathogène pour la souris.

2. *Bacillus subtilis.*

3. *Bacillus coli communis*, très fréquent.

4. Un coccobacille se colorant aux bouts et laissant le centre incolore. Gram indécis, plutôt négatif. Par ses autres qualités analogues au coli; ne donne pas la réaction de l'indol. Est à peu près constant dans le vagin de la femelle du cobaye.

5. Un tout petit bacille très mobile, se décolorant par le Gram.

6. Streptococcus pyogène.

7. Un très petit coccus en amas analogue au *Staph. albus.*

Tous ces microbes ont été ensemencés dans divers milieux en même temps que les microbes introduits expérimentalement; ils n'ont pas empêché le développement de ces derniers.

Comme on le voit, et je suis loin d'avoir épuisé la flore microbienne des animaux expérimentés, le vagin contient des microbes et des espèces microbiennes en assez grand nombre.

SUR LES ÉPIDÉMIES DE PESTE BUBONIQUE

A l'Assomption (Paraguay) et au Rosario (République Argentine)[1].

PAR LÉOPOLD URIARTE

Médecin de l'hôpital Rawson; attaché au Laboratoire des Grands Éleveurs, dirigé par M. J. Lignières, d'Alfort; membre de la Commission sanitaire argentine envoyée au Paraguay.

Dans les premiers jours du mois de septembre 1899, on apprenait à Buenos-Ayres que dans la ville de l'Assomption était apparue une maladie, à marche suraiguë, une fièvre maligne, disait-on. Elle avait pris un développement épidémique dans les casernes et les prisons de la ville.

Certains médecins soutenaient qu'on était en présence de la maladie connue sous le nom de *Buba*. J'ai eu plus tard l'occasion de m'assurer que cette « buba » doit être considérée comme une polyadénite d'origine syphilitique. L'immense majorité des médecins avouait ne pas connaître la nature exacte de cette nouvelle maladie, tout en reconnaissant des ressemblances cliniques assez grandes avec la peste bubonique.

Les autorités sanitaires de Buenos-Ayres, au courant de ces faits, soupçonnèrent aussitôt qu'il s'agissait de peste. Le docteur E. Wilde, président du Département national d'hygiène, pour lever tous les doutes, résolut d'envoyer au Paraguay deux médecins, MM. les Drs O. Voges et J. C. Delfino, qui, arrivés à l'Assomption le 14 septembre, annonçaient quelques jours après à Buenos-Ayres que, d'après leurs recherches bactériologiques, c'était bien la peste bubonique.

Le gouvernement argentin, avec l'assentiment des autorités du Paraguay, décida alors l'envoi sur les lieux infectés d'une

1. Dans l'intéressant mémoire qui nous a été envoyé sous ce titre par le Dr Uriarte en juin 1901, nous choisissons, pour la publier, la partie qui est l'intérêt général : c'est l'histoire du transport de la peste au milieu d'un continent, sans étapes intermédiaires.

commission médicale, dans le but d'étudier et combattre l'épidémie.

Cette commission était formée par les Drs C. Malbran, S. Alvarez, J. C. Delfino, O. Voges, A. Medina et L. Uriarte.

Marche et propagation du fléau à travers l'estuaire de la Plata et de ses affluents, le Parana et le Paraguay.

Quelques notions très rapides sur la configuration de l'estuaire de la Plata et de ses affluents principaux sont indispensables pour bien suivre la marche de l'épidémie de peste bubonique dans cette partie du continent américain.

L'estuaire de la Plata a une étendue de 35,000 kilomètres carrés; à l'embouchure, sa largeur atteint 180 kilomètres.

Le Paraguay, au bord duquel est bâtie l'Assomption, se jette dans le Parana qui, à son tour, déverse ses eaux dans la Plata, où se trouvent Buenos-Ayres sur la rive droite et Montevideo sur la rive gauche.

Formosa, Corrientes et Rosario sont trois villes argentines, situées la première sur le fleuve Paraguay, les deux autres sur le Parana.

Un navire quittant le port de Montevideo pour pénétrer dans le fleuve fait escale à Buenos-Ayres (200 kilomètres), Rosario (290 kil.), Corrientes (720 kil.), Formosa (170 kil.), Assomption (160 kil.)

La distance qui sépare Montevideo de l'Assomption est donc de 1,540 kilomètres, qui sont franchis en bateau à vapeur en sept jours.

Fait curieux, qui sera expliqué dans la suite, ayant franchi d'un bond l'océan Atlantique et ce magnifique cours d'eau, long de 1,600 kilomètres, la peste fait sa première apparition en Amérique en plein pays méditerranéen, au Paraguay.

De l'Assomption du Paraguay, par un trajet rétrograde, en suivant toujours la route maritime des communications commerciales, elle envahit successivement Formosa, Corrientes, Rosario et Buenos-Ayres.

Entrons dans le détail de la marche de l'épidémie. Le 19 avril 1899, le paquebot *Centauro* quittait le port de Montevideo à destination de l'Assomption. A Montevideo il reçut un charge-

ment de marchandises diverses et *des sacs de riz* qui furent placés dans la cale inférieure. Ces sacs de riz provenaient d'un navire d'outre-mer, ancré alors en rade de Montevideo, et furent transbordés directement au *Centauro* sans passer par la douane de la ville.

D'après les renseignements pris par le docteur Medina, ce navire arrivait de Rotterdam et aurait eu pendant la traversée deux morts dans l'équipage; on avait constaté en outre une mortalité parmi les rats.

Le 26 avril, le *Centauro* arrivait à l'Assomption. Le déchargement terminé, les matelots trouvèrent au fond de la cale inférieure, où étaient placés les sacs de riz, une trentaine de rats morts qui furent jetés à l'eau. Cette mortalité ne laissa pas de les surprendre.

Le lendemain même de l'arrivée, deux matelots G. F... et A. I... tombaient gravement malades. On les débarqua pour mieux les soigner; ils succombèrent tous les deux le 28 et le 30 avril. Chez le premier la mort arriva en moins de 36 heures on constata les symptômes suivants : point de côté très douloureux à droite du thorax, dyspnée, vomissements abondants, diarrhée, fièvre intense et un bubon dans l'aine.

Le 29 avril, deux autres matelots du *Centauro* étaient atteints subitement; le premier guérit en conservant pendant quelque temps une hypertrophie des ganglions inguinaux qui n'arrivèrent jamais à la suppuration; l'autre mourut le 3 mai. Voici le résultat de l'autopsie : foyers d'hépatisation pulmonaire; adhérences et congestion des deux plèvres; épanchements séro fibrineux dans les deux cavités pleurales; congestions et ecchymoses méningitiques; congestions et ecchymoses sous-muqueuses de l'estomac et de l'intestin; augmentation de volume du foie et des reins; rate hypertrophiée, congestionnée et ramollie. On remarqua l'existence d'un bubon sans attribuer à cette constatation une grande importance.

Les marchandises apportées par le *Centauro* furent débarquées en douane. Douze à quinze jours après l'arrivée du navire, les employés de la douane remarquèrent déjà un grand nombre de rats morts; cette mortalité ne tarda pas à se propager aux rongeurs du voisinage.

En juin et juillet on signale des cas parmi les charretiers et

les portefaix du port, et les marchands ambulants qui fréquentaient ces parages.

La situation méditerranéenne du Paraguay, séparé de tout foyer pesteux par d'immenses territoires indemnes, par l'Océan lui-même, sans communication directe avec l'Europe, était considérée comme une garantie plus que suffisante contre l'importation du bacille de Yersin, et faisait écarter le diagnostic de peste bubonique que certains médecins osaient prononcer avec timidité.

L'émoi causé par cette maladie à marche suraiguë, dont furent atteints les 4 matelots, se dissipa bien vite. Pendant 3 mois la tranquillité fut complète ; les cas de juin et juillet passèrent inaperçus, et c'est seulement l'enquête minutieuse faite par nous qui a permis de les relier entre eux et de les rattacher à leur véritable cause.

Au mois d'août, on s'émeut de nouveau. A ce moment il existe déjà un foyer important épidémique au quartier désigné sous le nom de *Rancheria de la Encarnacion*, situé tout près du port, formé de huttes où logent des femmes de soldats, et bien connu par son insalubrité.

A quelques mètres de ce quartier se trouvent les casernes de la ville, de vieux bâtiments d'aspect misérable. L'épidémie trouve là un terrain propice pour son développement. 37 soldats tombent malades; les autorités font disparaître par le feu les huttes de la Rancheria de la Encarnacion et décident l'évacuation d'une des casernes.

Les habitants de la Rancheria émigrent à la Chacarita et à la Loma Clavel, où se formèrent deux nouveaux foyers.

L'idée de l'existence d'une épidémie de peste bubonique prend corps tous les jours; mais, sans l'appui de la bactériologie, et peut-être aussi de propos délibéré, le diagnostic resta encore en suspens. On perdit un temps précieux en discussions inutiles, qui empêchèrent l'adoption de mesures énergiques capables d'arrêter la propagation du fléau.

Pendant le mois d'août, on constata 39 cas éparpillés dans toute la ville, dont plusieurs à la caserne, présentant tous les mêmes symptômes, aussi violents que ceux observés au mois d'avril.

D'après le diagnostic des médecins du pays, c'étaient des

cas de fièvre infectieuse typhoïde, purulente, gastrique, ou de méningite, pleuro-pneumonie, etc.

Au mois de septembre, après l'arrivée de la Commission argentine, le diagnostic de peste bubonique est officiellement accepté.

Au mois de septembre on déclare	53	cas
— octobre	67	—
— novembre	31	—
— décembre	18	—

Les environs de la ville et les localités situées sur l'unique ligne de chemin de fer de Paraguay furent aussi contaminés; on y signala plusieurs cas éparpillés, mais jamais de véritables foyers épidémiques.

La Commission argentine quitta l'Assomption le 28 janvier. Le gouvernement du Paraguay déclara l'épidémie éteinte au mois de février; cependant des cas continuaient à se produire et devinrent si nombreux qu'en juillet les autorités déclarèrent de nouveau l'existence de la peste dans la capitale de la république. Au mois d'août, on annonce officiellement la disparition du fléau, pour revenir encore une fois le 31 octobre à la déclaration de son existence. En somme la ville de l'Assomption et plusieurs localités des environs doivent être considérées comme des foyers probablement permanents de peste.

Dans ces derniers jours, la maladie vient reparaître à Ville-Conception, située à 400 kilomètres de l'Assomption, sur la rive droite du Paraguay.

La république Argentine est envahie à son tour au mois de 8septembre. A cette époque, au Rosario, ville de 105.000 habitants, située sur le fleuve Parana, trois portefaix des grands entrepôts du port tombent subitement malades : deux guérissent, le troisième meurt le 10 octobre.

Une autre personne, qui habitait la maison où logeaient ces portefaix, présente le 3 octobre les symptômes suivants : rachialgie, céphalalgie, fièvre élevée, dyspnée, râles sous-crépitants aux deux bases, albuminurie, larges ecchymoses dans les régions lombaires, et hypertrophie des ganglions inguinaux. Elle mourut le 21 octobre; autopsie : œdème des méninges; pneumonie du lobe inférieur du poumon droit; myocardite aiguë; congestion et hypertrophie du foie; conges-

tion, hypertrophie et ramollissement de la rate; néphrite aiguë; hémorragies sous-muqueuses de l'estomac et de l'intestin; hypertrophie et congestion des ganglions inguinaux avec infiltration périganglionnaire; ecchymoses sous-cutanées au niveau du thorax et suffusions sanguines intra-musculaires des lombes.

Presque en même temps, dans une maison voisine, une femme tomba malade. Le médecin qui la soigna nous fournit les renseignements suivants sur la marche de la maladie. Cette femme était enceinte presque à terme; elle présentait tous les signes classiques d'une pneumonie, avec angoisse prononcée. On observait quelques pétéchies sur la paroi abdominale des ganglions inguinaux et axillaires. Elle accoucha d'un enfant mort, sans présenter dans la suite des complications puerpérales. Elle succomba le 22 octobre. Autopsie : piqueté hémorragique des deux plèvres ; congestion et œdème pulmonaire; foyers de pneumonie; myocardite; foie congestionné et hypertrophié; néphrite parenchymateuse; piqueté hémorragique sous-muqueux dans l'estomac et sous-péritonéal dans l'intestin; ganglions inguinaux de la grosseur d'une noix avec infiltration du tissu cellulaire périganglionnaire.

En novembre on constatait dans les entrepôts du port une mortalité extraordinaire de rats. Les cadavres des rongeurs se trouvaient par centaines échelonnés le long des chemins qui conduisent aux dépôts de grains des compagnies des chemins de fer, à la Raffinerie argentine, et à La Germania, grand entrepôt de céréales et autres produits du pays destinés à l'exportation. Cette épidémie de rongeurs ne tarda pas à se montrer sur plusieurs points de la ville, principalement dans les entrepôts de bois provenant du Paraguay et dans les écuries.

Sur plusieurs rats morts qui étaient porteurs de vrais bubons, on trouva le microbe de Yersin.

« La Germania », la « Raffirnerie argentine » et les entrepôts de grains constituent les premiers en date et les principaux foyers d'infection. Les ouvriers de ces établissements payèrent un lourd tribut à l'épidémie.

Jusqu'au commencement de janvier, le diagnostic de presque tous ces cas fut erroné. A ce moment le nombre des malades devînt si considérable que les autorités sanitaires fédérales

s'alarmèrent, et décidèrent d'envoyer le Dr Delfino pour en faire l'étude clinique et bactériologique.

Tous les malades présentaient les symptômes observés à l'Assomption. Cliniquement il n'y avait pas de doute, on était en présence d'une épidémie de peste bubonique ; l'examen bactériologique révéla l'existence chez tous les malades du bacille de Yersin.

Vers la fin de janvier 1900, presque toute la ville était atteinte par l'épidémie. Les statistiques du lazaret signalent dans toute la ville :

Au mois de janvier	29	cas.
— février	29	—
— mars	36	—

Il nous a été impossible d'avoir le chiffre exact en avril et mai.

Le 11 mai, le gouvernement déclara officiellement que l'épidémie était éteinte.

Quelle est l'origine de cette épidémie de Rosario? L'enquête que nous avons faite ne nous permet pas de répondre catégoriquement à cette question. Tout porte à penser cependant que le point de départ des épidémies de peste observées dans la république Argentine se trouve à l'Assomption.

Le *Centauro*, qui a fait escale au Rosario le 22 avril, en route pour l'Assomption, n'a pas pu contaminer la ville, car c'est seulement à l'Assomption qu'on ouvrit la cale inférieure du navire où l'on trouva des rats morts. Si l'on tient compte d'autre part du nombre considérable de marchandises qui, du Paraguay, sont exportées au Rosario, les bois surtout qui logeaient très sûrement des nids de rats ; si l'on considère que les premiers foyers ont été observés dans les entrepôts de bois du Paraguay, on est autorisé à croire que le bacille de Yersin à été importé de l'Assomption au Rosario.

A Formosa, ville de 1,597 âmes, située sur le Paraguay, on signale le 6 novembre un premier cas. C'était un enfant, âgé de six ans, qui présenta tous les symptômes typiques de la peste avec bubon inguinal du côté gauche. On observa encore un autre cas, qui évolua en trois jours sous la forme d'une méningite pesteuse avec bubons. Les deux malades succombèrent ;

l'examen bactériologique des bubons révéla la présence du bacille de Yersin.

Il a été impossible d'établir l'origine de la contagion dans ces deux cas. On remarqua aussi une mortalité parmi les rats.

Des mesures énergiques prises à temps arrêtèrent le développement de l'épidémie.

A Corrientes, ville de 20,000 habitants, située sur le Parana, on signale un cas suspect le 23 octobre. Il s'agissait d'une femme présentant des symptômes d'une infection suraiguë avec bubons, et qui mourut en 50 heures.

A l'autopsie on trouva des ecchymoses sous-cutanées au niveau du thorax ; congestion et œdème pulmonaire ; épanchement séro-sanguinolent des deux cavités pleurales, avec piqueté hémorragique de la séreuse; ecchymoses péricardiques ; ecchymoses sous-péritonéales et congestion de l'intestin ; ecchymoses sous-muqueuses et sous-séreuses de l'estomac ; ecchymoses sous-capsulaires du rein et périrénales, qui s'étendaient à travers le tissu cellulaire sous-péritonéal jusqu'au petit bassin, et formaient des hématomes péri-ovariques. Engorgement inguinal et pelvien.

Il ne fut pas pratiqué d'examen bactériologique. Les autorités sanitaires de Corrientes considérèrent le cas comme suspect, et prirent des mesures en conséquence. On ne signala pas de nouveaux cas.

Le 26 *janvier*, on signale les deux premiers cas de peste à Buenos-Ayres, après examen bactériologique, parmi les employés du « Moulin de l'Ouest », où l'on constata aussi une mortalité extraordinaire de rats. Cette épidémie dura jusqu'au mois de mai : les cas observés, d'après les statistiques officielles, furent au nombre de 118. Je n'insiste pas davantage sur cette épidémie qui ne rentre pas dans le cadre de cette étude.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

15me ANNÉE DÉCEMBRE 1901 N° 12

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR LA VIEILLESSE

PAR EL. METCHNIKOFF

I

Sur le blanchiment des cheveux et des poils.

Avec les planches XIII et XIV.

Beaucoup de peuples sauvages suppriment leurs vieillards, les considérant comme tout à fait inutiles pour la tribu. Les peuples civilisés ne les tuent pas, mais les laissent souvent finir leur existence par le suicide. Les savants négligent l'étude de la vieillesse, un problème qui présente cependant un très grand intérêt.

La vieillesse, telle qu'elle se présente chez l'homme, doit être considérée comme quelque chose de très contradictoire parmi les phénomènes naturels. L'usure du corps et de l'esprit n'est point accompagnée du besoin de repos, et se manifeste le plus souvent à un moment où l'instinct de conservation et de vie est plus développé.

Dans cet état de choses, il est facile de supposer que peut-être la vieillesse, telle que nous l'observons actuellement, représente une forme anormale de l'existence, contre laquelle il y aurait peut-être quelque remède à chercher. Seulement, pour arriver à ce but, il est d'abord indispensable de se rendre compte de l'atrophie sénile d'une façon beaucoup plus complète que cela n'a été fait jusqu'à présent.

Je me suis donc proposé d'étudier la vieillesse au point de

vue biologique, et il est tout naturel de commencer ce travail par une recherche sur le mécanisme du blanchiment des cheveux et des poils. Ce phénomène constitue le plus souvent le premier signe de la vieillesse qui approche, et est un de ceux qui se présentent le plus constamment à un certain âge. Il est vrai que le blanchiment des cheveux et des poils peut quelquefois se produire chez des jeunes gens. On l'a même observé chez des enfants à titre d'exception. Il est non moins vrai qu'il y a des vieillards qui ne blanchissent que fort tard, et qui peuvent même atteindre un âge très avancé sans présenter un blanchiment des cheveux tant soit peu marqué

A la Salpêtrière, il y a en ce moment une vieille femme presque centenaire (100 ans moins quelques jours), dont la majeure partie des cheveux sont encore fortement pigmentés.

Malgré ces anomalies, la règle générale que les cheveux et les poils blanchissent à l'époque de la vieillesse existe non seulement chez les races humaines les plus variées, mais aussi chez d'autres mammifères. Les chiens et les chevaux, qui vieillissent beaucoup plus tôt que l'homme, accusent le blanchiment des poils d'une façon très marquée

Une des questions des plus importantes au sujet du blanchiment est de savoir si les cheveux et les poils pigmentés peuvent se décolorer, ou bien si ce ne sont que les cheveux et les poils de nouvelle formation qui poussent blancs. Plusieurs observateurs penchaient vers cette dernière conclusion et pensaient que le blanchiment n'est que le résultat d'un vice de développement, quand les cheveux et les poils poussent sans trace de pigment. Les faits de blanchiment brusque ne concordaient pas bien avec cette opinion, mais on essayait de la soutenir en admettant que le blanchiment normal suivait d'autres lois que le blanchiment pathologique.

Cependant Brown-Séquard [1] a démontré que, chez des personnes d'un certain âge, les poils peuvent blanchir en perdant leur pigment en un espace de temps très court. Il a observé chez lui-même, à l'âge de quarante-cinq ans, que les poils de sa barbe blanchissaient en deux jours et même moins. En arrachant ses poils blancs, il a vu que les nouveaux apparaissent non pas à la suite d'un développement de poils jeunes, blancs dès le début,

1. *Archives de physiologie norm. et path.*, 1869, p. 442.

mais se formaient à la suite de la perte de pigment chez des poils anciens. Brown-Séquard conclut que ses observations « mettent hors de doute la possibilité d'une transformation très rapide (probablement en moins d'une nuit) de poils noirs en poils blancs » (p. 443). Ce blanchiment se faisait dans des conditions normales, sans qu'une forte émotion ou une autre circonstance particulière vînt accélérer ce phénomène.

M. Jean Charcot a pu sur lui-même confirmer la donnée de Brown-Séquard, et m'a donné des poils de ses moustaches et de sa barbe qui présentaient tous les états intermédiaires entre le noir et le blanc. Le blanchiment se faisait aussi en un espace de temps assez court.

On a depuis longtemps commencé l'étude du blanchiment des cheveux, mais le mécanisme de ce phénomène a jusqu'à présent échappé aux observateurs. Dans son atlas des cheveux, qui jouit de la réputation justifiée d'un ouvrage classique, M. Waldeyer [1] s'exprime à ce sujet de la façon suivante : « Malgré que nous connaissions exactement les conditions physiques du blanchiment des cheveux, nous n'avons cependant aucun point d'appui pour expliquer la disparition de leur pigment. » Bientôt après, M. Ehrmann [2] s'est mis à étudier le blanchiment précoce. Pour lui, dans ce cas, les cheveux se développent sans pigment, parce que les cellules conjonctives qui le déposent dans les éléments d'origine épidermique ne remplissent pas leur fonction.

M. Ehrmann admet, avec Riehl, Kölliker et quelques autres observateurs, que les cellules propres des cheveux sont incapables de développer les grains pigmentés. Ceux-ci sont toujours produits par les cellules ramifiées du derme, qui pénètrent dans la couche épidermique des cheveux et remplissent les cellules cornées de pigment. Dans le blanchiment précoce, les cellules conjonctives ramifiées sont développées de la façon normale. Eh bien, malgré la production ininterrompue du pigment dans le derme, le cheveu peut pousser blanc, car le pigment n'est point transporté dans les cellules cornées.

M. Jarisch [3] a critiqué cette théorie d'Ehrmann, et on peut

1. *Atlas d. menschl. u. thierisch. Haare.* Lahr, 1884, p. 42.
2. *Archiv für Dermatologie u. Syphilis,* 1885 et 1886.
3. *Archiv für Dermatologie u. Syphilis,* 1892.

considérer comme bien démontré que les granules pigmentaires se forment dans l'intérieur des éléments de l'épiderme. M. Post[1], qui a publié un des derniers travaux sur ce sujet, se place sur un terrain de conciliation. Pour lui, le pigment se forme dans les cellules épidermiques et, entre autres, dans des cellules ramifiées qu'il considère également comme appartenant à l'épiderme et non au tissu conjonctif. D'un autre côté, cet observateur pense que les éléments ramifiés peuvent déverser une partie de leur pigment dans l'intérieur des cellules épidermiques, conformément à l'opinion de plusieurs savants déjà cités.

Ces discussions sur l'origine du pigment des cheveux ne touchent pas à la question du blanchiment d'une façon directe, mais présentent néanmoins une grande importance pour la solution de cette question, et c'est pour cela que la théorie du blanchiment précoce, formulée par M. Ehrmann, se rattache à son opinion sur le rôle des cellules ramifiées dans la pigmentation des cheveux.

M. Unna[2], une des principales autorités pour tout ce qui concerne l'histologie de la peau et de ses annexes, ne paraît pas partager les théories de M. Ehrmann. Il pense qu'elles sont trop compliquées, et que l'avenir devra simplifier l'interprétation des faits. M. Unna constate en plus qu'il n'existe encore aucune théorie du blanchiment sénile, et conseille de réunir des faits nouveaux sur l'atrophie du pigment des cheveux dans les conditions diverses.

Mais comme ce n'est pas d'aujourd'hui qu'on s'est mis à étudier les phénomènes du blanchiment des cheveux, il est évident que, dans la recherche de faits nouveaux, il est nécessaire d'avoir quelque point d'appui capable de guider les observateurs.

Ayant la conviction, basée sur des données précises, que la phagocytose joue un rôle prépondérant dans les atrophies en général, nous nous sommes demandé si la théorie phagocytaire ne serait pas capable d'éclaircir la question de la disparition du pigment des cheveux et des poils. Nous nous sommes donc mis à l'étude, espérant d'un côté contribuer à la solution du problème de l'atrophie du pigment, et, de l'autre, trouver une

1. *Virchow's Archiv*, 1894, t. CXXXV, p. 479.
2. *Die Histopathologie der Hautkrankheiten*, Berlin, 1894, p. 1082.

nouvelle pierre de touche de la viabilité et de l'utilité de la théorie des phagocytes.

Nous nous sommes adressé d'abord à des vieux chiens, dont les poils ont présenté un blanchiment plus ou moins avancé. Seulement, avant d'exposer les résultats de nos observations sur la perte de pigment, nous devons dire quelques mots sur les poils de chiens jeunes et normaux.

Les poils pigmentés de ces animaux ne se laissent pas facilement étudier à l'état frais et normal, car la grande quantité de grains pigmentés ne permet d'apercevoir qu'une masse foncée uniforme. Il faut donc d'abord faire bouillir les poils dans des solutions alcalines, par exemple dans le carbonate de soude à 100 0. Dans ces conditions, on distingue aussitôt la couche médullaire de la partie périphérique et de la cuticule. Cette dernière est totalement privée de pigment, tandis que la couche cornée, constituée par des éléments fusiformes très minces, ainsi que la couche médullaire, en renferment une grande quantité Le pigment se présente sous forme de petites granulations, contenues sûrement dans l'intérieur des cellules. Quant au pigment à l'état soluble, nous ne l'avons trouvé que dans des poils jaunes ou roux.

L'étude du développement des poils chez des chiens tout jeunes démontre d'une façon incontestable que les grains de pigment se développent dans l'intérieur des cellules d'origine épidermique. Dès le début, on trouve, dans l'intérieur des éléments de la couche médullaire, de nombreux grains foncés, tandis que la papille du bulbe n'en renferme pas du tout. La théorie d'après laquelle le pigment est importé dans les éléments de poils naissants par des cellules pigmentées et ramifiées du derme ne trouve aucune confirmation.

Parmi les poils d'un vieux chien (de race Mâtin), âgé de 16 ans, j'ai trouvé, à côté de poils normaux, très pigmentés, d'autres qui étaient déjà complètement blancs. Mais, entre ces deux extrêmes, il s'est trouvé des poils dans lesquels le pigment des deux couches était moins abondant que chez les poils normaux, et qui, en revanche, renfermaient des cellules pigmentées, munies de prolongements protoplasmiques très développés. Ces cellules se trouvaient entre les deux couches du poil, ou bien elles étaient logées dans la couche périphérique. La pré-

sence d'un noyau rond ou ovale dans l'intérieur du corps cellulaire, ainsi que les pseudopodes multiples (fig. 7, 8), ne laissait pas douter que nous avions affaire à des éléments bien constitués, qui se présentaient justement dans des poils en train de perdre leur pigment.

L'étude d'un vieux chien danois, âgé de 13 ans, que nous devons à l'obligeance de notre ami M. Nocard, nous a fourni des renseignements importants sur les cellules pigmentées des poils en voie de blanchiment. Déjà, chez des jeunes chiens de cette race, au milieu de poils de constitution tout à fait pareille à ceux des chiens en général, on trouve un certain nombre de cellules pigmentées, disposées entre les deux couches principales (fig. 1, *c*). Seulement ces cellules sont peu nombreuses, sauf chez des poils exceptionnels.

Les chiens danois deviennent bientôt gris, et les poils du vieux chien mentionné étaient devenus gris clair et par endroits tout blancs. Eh bien, chez cet animal, la quantité des cellules pigmentées intermédiaires entre les deux couches est devenue tout à fait extraordinaire. Sur des poils traités par du carbonate de soude, la couche médullaire se présentait couverte d'une très grande quantité d'éléments très foncés, de formes très diverses (fig. 3).

Tantôt ce sont des masses rondes ou ovales, tantôt des éléments munis de prolongements plus ou moins nombreux. La quantité de pigment est tellement grande que le noyau est le plus souvent complètement caché par lui. Et cependant la nature cellulaire des éléments en question ne peut guère être mise en doute.

Dans la partie périphérique des poils, on trouve également une quantité des mêmes cellules pigmentées (fig. 2), présentant souvent des formes bizarres.

L'apparition d'une grande quantité de ces éléments pigmentés coïncide avec la disparition des grains de pigment dans le reste du poil et notamment dans sa couche périphérique. Il est évident que nous avons affaire ici à des cellules qui s'incorporent le pigment des éléments fusiformes de cette couche. Très souvent on trouve des poils dont la couche périphérique est déjà entièrement incolore et ne renferme de pigment que dans l'intérieur des cellules pigmentées allongées ou ramifiées. Ces cellules

sont donc des véritables *pigmentophages* qui dépouillent de leur pigment les éléments normaux de la couche périphérique des poils.

Pour se rendre compte d'une façon plus complète des rapports entre les pigmentophages et les éléments fusiformes de la couche périphérique, il est nécessaire de traiter les poils avec de l'acide sulfurique. Dans ces conditions, on trouve les cellules, remplies de pigment, dans des rapports très intimes avec les éléments fusiformes. Ceux-ci présentent des excavations profondes (fig. 4, *c*), occupées par les pigmentophages. Ces cellules se trouvent quelquefois (fig. 4, *b*) étroitement logées entre deux éléments fusiformes, avec lesquels elles présentent une forte adhérence. Il est donc évident que les pigmentophages s'insinuent dans l'intérieur des éléments de la couche périphérique (fig. 4, *a*) pour absorber leur grains de pigment. Les détails de ce processus sont très difficiles à observer, mais tout l'ensemble de faits indique bien qu'il s'agit ici d'un acte de phagocytose de la part des pigmentophages.

Quels sont l'origine et le sort de ces cellules? La première de ces questions peut être résolue sans difficulté sur des poils traités par le carbonate de soude. La couche médullaire de ces poils est composée d'une rangée de cellules aplaties qui, à l'état normal, sont remplies de grains pigmentés. Plus tard, la quantité de pigment diminue dans ces cellules, et on le voit alors distribué d'une façon très inégale. A côté de cellules riches en grains pigmentés, on en voit d'autres qui n'en renferment presque pas ou même qui en sont entièrement privées. Dans des poils qui blanchissent, quelques éléments de la couche médullaire quittent leur place habituelle; ils se mobilisent et passent à la périphérie de cette couche ou même pénètrent dans la couche périphérique (fig. 5, 6). Il est donc hors de doute que les pigmentophages dérivent des éléments de la couche médullaire et sont par conséquent d'origine épidermique. J'ai cherché à établir si une partie des pigmentophages ne provenait pas de la transformation et de la mobilisation des éléments fusiformes de la couche périphérique. Mes observations ne m'ont pas permis de résoudre cette question dans un sens affirmatif.

Les pigmentophages sont donc des cellules d'origine ectoblastique qui dévorent les grains pigmentés et les transportent

en dehors des poils. Dans des poils dont toute la couche périphérique est déjà entièrement blanche, on trouve encore, sur la surface de cette couche, un certain nombre de pigmentophages bourrés de grains colorés. Mais, dans d'autres poils, on ne voit plus ni pigment ni pigmentophages, et c'est alors que les poils sont tout à fait blancs.

Sur des coupes de la peau prélevée au vieux chien danois, on peut facilement suivre quelque phases ultérieures du transport des grains pigmentés. On trouve des amas de cellules pigmentées dans le bulbe de poils qui eux-mêmes ne contiennent pas ou ne contiennent que très peu de pigment. Il faut donc en conclure que les pigmentophages sont descendus dans la racine des poils (fig. 20, *a*). Sur les mêmes préparations, on rencontre des cellules pigmentées en dehors des poils, mais dans leur voisinage. C'est ainsi que, près des bulbes, on trouve dans le tissu conjonctif des cellules bourrées de grains pigmentés (fig. 20, *p*). L'étude détaillée des faits amène à cette conclusion que ces éléments pigmentés du derme ne sont autre chose que des pigmentophages. Après avoir quitté les poils et les bulbes, ces éléments se sont répandus dans le tissu conjonctif environnant. On les voit munis de prolongements plus ou moins développés et on leur trouve un noyau parfaitement net. A cause de cette particularité, on pourrait croire que ces cellules se distinguent des pigmentophages rencontrés dans l'intérieur des poils. Mais il est facile de trouver des formes intermédiaires, c'est-à-dire des cellules logées dans le derme et munies d'une grande quantité de pigment qui recouvre totalement le noyau. En comparant ces formes variées, on arrive à la conclusion qu'une partie des grains pigmentés doit disparaître dans l'intérieur des pigmentophages, et permettre à cause de cela de distinguer le noyau.

Chez le vieux chien danois dont j'ai étudié la peau, les cellules pigmentées du derme aux environs des poils sont nombreuses. Au contraire, dans la peau de jeunes chiens dont les poils sont très riches en pigment, le derme est totalement dépourvu de ces cellules. Ce fait corrobore donc la conclusion que ces éléments proviennent en dernière instance des pigmentophages des poils.

Dans mes recherches sur le blanchiment des poils chez les

chiens, je n'ai jamais observé de dissolution de grains colorés, ce qui prouve une fois de plus que la perte de pigment par les poils se fait non pas à la suite d'une dissolution, mais bien par son transport dans le bulbe et le derme.

Les recherches sur les chiens nous ont servi uniquement pour nous orienter dans l'étude du blanchiment des cheveux et des poils chez l'homme.

Chez des personnes jeunes ou âgées, dont les cheveux et les poils blanchissent, on en trouve sans difficulté qui présentent des stades intermédiaires. Ainsi on rencontre des cheveux dont une partie seulement est blanche, tandis qu'une autre a encore bien conservé sa coloration; ou bien des poils qui, sans être blancs, se distinguent par une coloration beaucoup moins foncée qu'à l'état normal. C'est dans ces conditions que le mécanisme du blanchiment peut être le mieux observé. En examinant au microscope ces cheveux ou poils, en y ajoutant simplement une goutte d'eau, mais sans aucune autre préparation, on trouve facilement des pigmentophages plus ou moins nombreux. Ce sont des cellules remplies de pigment, et munies de 2 ou d'un plus grand nombre de prolongements qui souvent se distinguent par une longueur vraiment extraordinaire. Les pigmentophages occupent des places variées dans le cheveu, et on trouve leurs prolongements très minces s'insinuant entre les éléments fusiformes de la couche corticale (fig. 13). Le plus souvent les pigmentophages accusent des formes ovales et allongées (fig. 17, 18), mais quelquefois on les trouve avec un corps arrondi et des prolongements nombreux et ramifiés (fig. 11, 15). Grâce à la richesse en grains pigmentés, les cellules et leurs appendices se laissent très facilement apercevoir, de sorte qu'il est tout à fait inutile de recourir à des méthodes de coloration artificielle. Le noyau est également très bien visible sous forme d'une tache claire, ronde ou ovale. Dans des cheveux colorés normalement, ainsi que dans d'autres qui ont déjà définitivement blanchi, on ne trouve pas de pigmentophages, tandis que dans les cheveux en train de blanchir, on les trouve constamment. Ceci prouve que ces éléments sont réellement en rapport intime avec la perte de pigment.

J'ai constaté la présence des pigmentophages dans le blan-

chiment sénile, ainsi que dans le blanchiment précoce. Je les ai trouvés chez une femme centenaire de la Salpêtrière (fig. 17, 18) tout aussi facilement que chez les jeunes personnes qui, à l'âge de 28 ans, ont déjà commencé à avoir des cheveux blancs (fig. 10, 15, 16). Les poils chez l'homme se comportent de la même façon que les cheveux blanchissants, et on y rencontre des pigmentophages exactement pareils.

Chez une dame de 28 ans, ainsi que chez un jeune homme du même âge, dont les chevelures manifestent un blanchiment précoce assez avancé, j'ai pu me convaincre que les pigmentophages proviennent des éléments de la couche médullaire. M. Waldeyer (*l. c.*, p. 19) hésitait à se prononcer d'une façon affirmative sur la présence de pigment granuleux dans cette partie de cheveux humains. Mes observations ne laissent aucun doute à ce sujet. Le pigment se trouve dans l'intérieur des cellules aplaties de la couche médullaire, non seulement chez les divers mammifères, mais aussi chez l'homme. Les grains foncés de ces éléments peuvent nous guider facilement dans la recherche de l'origine des pigmentophages. Certaines cellules de la couche médullaire (fig. 14) se détachent de cet endroit pour émigrer dans la couche corticale. C'est là qu'elles dévorent les grains pigmentés, ce qui les fait augmenter de volume et les fait ressortir d'une façon très apparente.

Au fur et à mesure que les cheveux et les poils blanchissent, leur pigment disparaît de plus en plus, et la quantité des pigmentophages devient également de plus en plus petite. Lorsqu'on arrache un poil blanc dans lequel on ne trouve que quelques rares pigmentophages, on peut trouver dans le bulbe une grande quantité de ces cellules (fig. 19). Il est évident que les pigmentophages descendent le long des cheveux et des poils pour se réunir dans le bulbe. Mais plusieurs faits que j'ai pu observer m'ont convaincu qu'une partie des pigmentophages se rendent à la périphérie des cheveux et passent totalement au dehors.

On a souvent exprimé l'opinion que, dans le blanchiment des cheveux, c'est la pénétration de l'air qui joue le rôle le plus important. Cette opinion ne peut nullement être soutenue. Il y a bien des gaz qui se trouvent dans les cheveux qui blanchissent, mais il y en a aussi dans des cheveux qui sont foncés. Le blanchiment est le résultat de la perte du pigment, qui est transporté

par les pigmentophages dans le bulbe ou bien en dehors des cheveux.

Le mécanisme du blanchiment est, dans sa partie essentielle, le même chez le chien et chez l'homme. Il n'y a aucune différence fondamentale dans ce phénomène, qu'il s'accomplisse dans les poils de l'homme et du chien ou bien dans les cheveux humains. Le mécanisme est le même dans le blanchiment précoce ou sénile.

Des recherches nouvelles sont nécessaires pour éclaircir le développement des cheveux et des poils blancs. Nous avons dit que, d'après M. Ehrmann, ce phénomène doit s'expliquer par l'impossibilité pour les cellules ramifiées, fournisseuses du pigment, de rejeter les grains pigmentés dans les cellules de la couche cornée. Cette opinion est basée sur le fait que, dans le bulbe des cheveux blancs, les cellules pigmentées ne font point défaut. Il faut voir s'il ne s'agit pas dans ce cas de pigmentophages réunis dans le bulbe. Peut-être ces éléments, particulièrement avides de pigment, ne laissent-ils point les grains colorés se déposer dans les cellules des jeunes cheveux ? Cette question ne peut être résolue que par des observations spéciales, dirigées vers ce point. Mais il est évident que notre ignorance sur la cause qui fait que les cheveux et les poils peuvent se développer sans pigment ne touche en rien au blanchiment des cheveux et des poils pigmentés.

Comme les phagocytes, si répandus dans le règne animal, sont le plus souvent d'origine mésoblastique, on pourrait se demander si la nature épidermique des pigmentophages ne présenterait pas quelque chose de paradoxal et de difficilement acceptable. Pour lever tous les scrupules, il n'y a qu'à se rappeler les exemples de phagocytes qui dérivent de l'ectoblaste. Nous avons déjà décrit, dans notre premier mémoire sur la phagocytose[1], ce fait que des appendices des hydropolypes, organes connus sous le nom de *Nematocalyces*, sont couverts de cellules ectodermiques qui englobent toute sorte de corps étrangers. Nous avons également mentionné des larves d'actinies, dont les cellules de l'ectoderme saisissent régulièrement des corpuscules de leur entourage. Plus tard, M. Faus-

1. *Arbeiten d. zool., Instit. zu Wien*, 1883, t. V, p. 142.

sek[1] a observé la phagocytose par les éléments ectoblastiques du manteau des larves d'anodontes.

Mais ce ne sont pas seulement les Invertébrés chez lesquels on a rencontré des exemples de phagocytose ectoblastique. Chez l'homme même, il y a des cas où ce genre de phagocytose ne peut pas être mis en doute. Soudakewitch[2], le premier, a trouvé des bacilles lépreux dans l'intérieur des cellules nerveuses des ganglions périphériques. M. Babes[3] a étendu ce même fait aux éléments nerveux de la moelle épinière. Or, il est incontestable que les bacilles lépreux ne peuvent parvenir dans l'intérieur de ces cellules, d'origine ectoblastique certaine, autrement que par l'intermédiaire des mouvements actifs de certains dendrites.

Les pigmentophages qui font blanchir les cheveux et les poils rentrent donc parfaitement dans la catégorie des phagocytes ectoblastiques, certainement beaucoup moins nombreux que ceux qui proviennent du mésoblaste.

Le mécanisme du blanchiment que nous avons décrit ne nous révèle que la cause immédiate de ce phénomène. Il reste à savoir pourquoi les pigmentophages se mettent, à un moment donné, dans un état de suractivité, et dévorent le pigment de la couche cornée pour le transporter dans le bulbe et le derme. Il est connu que certaines maladies infectieuses amènent le blanchiment précoce des cheveux, localisé ou général. Ainsi on a observé quelquefois que chez des jeunes personnes, atteintes de fièvre typhoïde, les cheveux commencent à blanchir dans le courant de la maladie ou après la convalescence. Plusieurs savants[4] ont vu les cils devenir blancs dans l'ophtalmie sympathique. consécutive à la destruction de l'œil opposé. Il est très probable que, dans ces exemples, ce sont des substances toxiques qui excitent l'activité des pigmentophages et leur font transporter les grains pigmentés.

Depuis longtemps, on a signalé des exemples de blanchiment des cheveux très rapide, qui peut s'effectuer en peu de jours et quelquefois même dans l'espace d'une nuit. Autrefois, on ne voulait pas même croire à la possibilité de pareils phénomènes, tellement ils paraissaient difficiles à concevoir et à expliquer. Et

1. *Biologisches Centralblatt*, 1895, p. 115.
2. *Ziegler's Beiträge z. pathol. Anatomie*, 1888. t. II, p. 129.
3. *Histologie d. Lepra*, 1898, p. 68.
4. Nettleship, *The Lancet*, 1883, 22 décembre.

cependant il s'est accumulé dans la science sous ce rapport un nombre de faits si grand que la négation est devenue tout à fait impossible. Nous n'avons pas besoin d'énumérer ici tous les cas de blanchiment brusque et rapide, enregistrés dans les annales scientifiques. Le lecteur en trouvera réunis un grand nombre dans les travaux de Charcot[1], de Leloir et Vidal[2].

Récemment, M. Schmidt[3], en réponse à la demande de M. Virchow de lui communiquer des renseignements sur des exemples de blanchiment rapide, a décrit un cas de ce phénomène. Il s'agit d'un ouvrier, âgé de 36 ans, qui s'est présenté avec deux mèches blanches des cheveux. Le blanchiment s'est produit dans l'espace d'une nuit, à la suite d'un accident de chemin de fer qui faillit écraser cet individu, à ce moment âgé de 28 ans seulement.

Le fait que le blanchiment des cheveux est le résultat du transport du pigment par les pigmentophages permet, je crois, d'expliquer les cas de blanchiment rapide. On conçoit facilement que, sous l'influence de stimulants exceptionnellement forts, les mouvements des pigmentophages se fassent plus rapidement que d'habitude. On connaît bien des cas de résorption très rapide d'exsudats inflammatoires. Or, ce phénomène est également dû à l'activité des phagocytes.

Les émotions violentes exercent une influence incontestable sur les fonctions de la vie organique, et peuvent en modifier et augmenter les sécrétions. Il se peut donc bien que, dans ces conditions, les pigmentophages soient stimulés d'une façon toute particulière. Or, le fait que les éléments des cheveux et des poils peuvent absorber certaines substances est prouvé par la présence de l'arsenic dans les cheveux et les poils des hommes et des animaux empoisonnés.

Le blanchiment, intermittent ou annelé, qui a été décrit comme une rareté et comme un phénomène des plus difficiles à expliquer, peut également être conçu au point de vue que nous soutenons dans ce travail. Une fois que le mécanisme du blanchiment se réduit à une activité des pigmentophages, il devient possible de supposer qu'une partie de ces cellules est

1. *Gazette hebdomadaire*, 1861, p. 445.
2. *France médicale*, 1890, p. 244.
3. *Virchow's Archiv.*, 1899, t. CLVI, p. 190.

apte à remplir sa fonction destructive, tandis que l'autre reste inerte pendant une période de temps plus ou moins longue.

Comme les pigmentophages creusent les cheveux par leurs mouvements et leurs appendices protoplasmiques, on conçoit facilement que, dans ces conditions, l'air puisse plus facilement pénétrer dans la profondeur. Certains changements de forme des cheveux peuvent être expliqués par la même cause.

Le fait que le blanchiment se produit surtout pendant la nuit indique bien que les pigmentophages manifestent leur activité principalement pendant cette période de la journée. Aussi nous avons pu observer les meilleurs exemples de pigmentophagie sur des cheveux prélevés à minuit.

Peut-être la révélation du mécanisme du blanchiment des cheveux et des poils pourra-t-elle servir pour la recherche des moyens d'empêcher ce phénomène. Ces annexes de la peau sont accessibles aux agents physiques et chimiques qui peuvent facilement tuer les pigmentophages et, par conséquent, les empêcher dans cette œuvre destructrice. Cette question, ainsi que plusieurs autres qui se rattachent au blanchiment des cheveux et des poils, ne peut être résolue que par des recherches ultérieures.

EXPLICATION DES PLANCHES XIII ET XIV

Fig. 1. — Une partie de poil d'un chien danois, âgé de 2 ans. Le poil a été traité par une solution de soude à 10 0/0; *c*, pigmentophage; *m*, cellules de la couche médullaire.

Fig. 2. — Pigmentophage de la couche périphérique du poil d'un vieux chien danois de 13 ans. Traitement par de la soude à 10 0/0.

Fig. 3. — Couche médullaire d'un poil du même chien, après traitement avec de la soude à 10 0/0.

Fig. 4. — Trois cellules de la couche périphérique du poil du même chien. Traitement par l'acide sulfurique; *a*, cellule avec un pigmentophage enfoncé dans sa profondeur; *b*, deux cellules avec un pigmentophage au milieu; *c*, une cellule avec une excavation profonde, dans laquelle était logé un pigmentophage.

Fig. 5, 6. — Couche médullaire de deux poils du même chien. Traitement par la soude à 10 0/0.

Fig. 7. — Un pigmentophage du poil d'un vieux chien de 16 ans. Le poil a été traité avec de la soude à 10 0/0.

Fig. 8. — Deux autres pigmentophages soudés du même chien.

Fig. 9. — Partie pigmentée d'un cheveu à moitié blanchi d'une dame de 28 ans.

Fig. 10. — Partie blanche d'un cheveu de la même personne, avec plusieurs pigmentophages.

Fig. 11. — Un des trois pigmentophages de la figure 10.

Fig. 12, 13. — Deux fragments d'un cheveu en partie pigmenté, en partie blanc de la même personne. Passage des pigmentophages de la couche médullaire à la périphérie.

Fig. 14. — Une partie d'un cheveu d'un homme de 28 ans. Ce cheveu est en partie pigmenté, en partie blanc. Passage des pigmentophages de la couche médullaire à la périphérie.

Fig. 15. — Une autre partie du même cheveu avec un pigmentophage à pseudopodes ramifiés.

Fig. 16. — Un pigmentophage d'un cheveu blanc de la même personne.

Fig. 17, 18. — Deux fragments de cheveux grisonnants d'une vieille femme, âgée de 100 ans.

Fig. 19. — Cellules pigmentées du bulbe de poil blanc de la barbe d'un homme de 34 ans.

Fig. 20. — Coupe de la peau du vieux chien danois ; *a*, cellules pigmentées du bulbe ; *p*, pigmentophages dans le derme. (Cette coupe a été faite par M. le Dr Ivanoff.)

DE L'HÉMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

PAR LE Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Quand on fait l'autopsie d'un lapin mort de streptococcie, on est souvent frappé de l'aspect particulier de son sang. Un tube effilé plongé dans le cœur ou à l'intérieur d'un gros vaisseau ramène un liquide d'un beau rouge, mais complètement transparent. Le sang est laqué, aurait-on dit autrefois; nous dirons, pour nous servir d'un terme plus moderne, qu'il est hémolysé [1].

Cette hémolyse du sang est un phénomène des plus fréquents chez des lapins inoculés avec un streptocoque très virulent; il n'est pas constant : il y a des cas, rares, il est vrai, et dont il sera question plus loin, où, malgré la virulence du microbe, le sang des lapins morts d'infection streptococcique, n'est pas dissous, du moins, au moment de la mort.

Le streptocoque est le seul microbe, à notre connaissance, capable de déterminer l'hémolyse du sang du vivant de l'animal, *dans l'organisme même*, ce en quoi il diffère essentiellement de tous les autres microbes, qui ne deviennent hémolysants que *in vitro* et jamais *in vivo*, comme le B. tétanique [2], le B. pyocyanique [3], le staphylocoque [4], le B. typhique [5] et quelques autres [6].

1. C'est M. J. Bordet qui, à notre connaissance, a le premier signalé ce phénomène; voici ce qu'il dit à ce sujet dans son mémoire sur le sérum antistreptococcique (*Ces Annales*, 1897, p. 177) : « Au moment de la mort, l'examen du sang trahit des altérations manifestes des globules rouges. Ceux-ci ont presque entièrement disparu. Le cœur d'un lapin autopsié immédiatement après la mort contient un caillot rouge clair imbibé d'un sérum où l'hémoglobine s'est largement diffusée. Si l'on cherche, en malaxant ce caillot dans une petite quantité de sérum, à en faire sortir les globules rouges, on obtient un liquide où l'on ne trouve plus que des débris de ces éléments, qui ne montrent plus de contours cellulaires distincts. »

2. EHRLICH, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1898, n° 12. — MADSEN, *Zeitschr. f. Hygiene und Infectionskrankheiten*, 1899, p. 214.

3. BULLOCH et HUNTER, *Centralbl. f. Bakteriol*, Bd. XXVIII, 1900 ; n° 25. — WEINGEROF, *ibid.* 1901; n° 20.

4. NEISSER et WECHSBERG, *Zeitschrift. f. Hygiene*, Bd. XXXVI, 1901.

5. LEVY *u.* PROSPER LEVY, *Centralbl. f. Bakl.*, Bd. XXX, 1901 ; n° 10.

6. LUBENAU, *ibid.*, 1901, n° 10. KRAUSS et CHAIRMONT. *Wien. klin. Woch.*, 1900, n° 3.

En plus, les microbes que nous venons de citer acquièrent généralement la propriété hémolytique en vieillissant, après avoir séjourné en milieu artificiel pendant des jours et des semaines, ce qui les distingue une fois de plus du streptocoque, qui est un microbe naturellement hémolytique, pour ainsi dire, car il exerce son action hémolysante sur les globules alors qu'il se multiplie activement, et par contre, perd cette propriété au fur et à mesure qu'il vieillit et qu'il vit en milieu artificiel.

Du reste, au cours de cet exposé, on aura souvent l'occasion de constater que l'hémolysine du streptocoque occupe une place à part au milieu des autres hémolysines microbiennes, autant par son mode de préparation que par ses propriétés physico-chimiques et physiologiques.

*
* *

Le streptocoque dont nous nous sommes servi dans nos expériences est celui de M. Marmorek; il tue le lapin en injection sous-cutanée, à des doses très faibles, 1 ou 2 gouttes; le milieu dans lequel nous conservions le microbe était le bouillon-ascite (milieu Marmorek[1]) dont nous nous sommes très bien trouvé. Le mélange de 2 parties de bouillon pour 1 partie de liquide d'ascite est incontestablement supérieur aux autres milieux, pour l'entretien du streptocoque qui y vit bien et garde pendant assez longtemps sa virulence acquise par les passages.

La première idée qui vient à l'esprit dès que l'on se propose d'isoler la substance hémolysante du streptocoque est, naturellement, de s'adresser à son milieu de choix : c'est ce que nous avons commencé par faire.

Étant donné que le streptocoque dissout le sang très fortement dès qu'il commence à être visible dans les cultures, c'est-à-dire dès les premières heures qui suivent l'ensemencement, nous avons conclu qu'il ne faut pas attendre que la culture soit vieille pour chercher si elle est douée d'un pouvoir hémolytique.

Guidés par cette considération, nous avons préparé une culture en bouillon-ascite, et 24 heures après, quand elle a été

1. *Ces Annales*, 1895, p. 593.

déjà très abondante, nous l'avons séparée des microbes à la bougie Chamberland, dans l'espoir de découvrir dans le filtrat l'hémolysine. Or, ce filtrat essayé vis-à-vis de différentes espèces de globules rouges se montra aussi peu hémolytique que l'est le bouillon-ascite avant qu'il soit ensemencé.

Comme, d'une part, la culture entière mélangée à du sang défibriné dissolvait activement les globules, et comme, d'autre part, le filtrat n'en dissolvait aucunement, il ne nous restait qu'à en conclure que l'hémolysine en question est intimement liée aux corps microbiens et que le streptocoque ne la laisse point diffuser dans le milieu ambiant.

Sans nous décourager de ce résultat négatif, nous avons cherché à varier les milieux de culture ; après de nombreux tâtonnements dont il serait inutile d'entretenir le lecteur, nous avons réussi à obtenir une solution d'hémolysine streptococcique, qui par l'intensité de son action ne cède presque en rien à celle de la culture entière de streptocoque vivant et virulent.

* * *

Il y a deux conditions importantes à réaliser pour cela : une concerne le milieu, l'autre le microbe.

Pour ce qui concerne *le milieu*, il est nécessaire qu'il diffère aussi peu que possible du milieu naturel, dans lequel le streptocoque opère l'hémolyse du vivant de l'animal.

Les sérums sanguins, aussitôt que le caillot est retiré, se prêtent généralement très bien à la production de l'hémolysine ; en ajoutant à du sérum 1 ou 2 gouttes de sang défibriné, avant l'ensemencement du streptocoque, on amorce la sécrétion qui se poursuit ensuite toute seule et très rapidement.

Certes, le sérum, tel qu'on l'obtient généralement après la coagulation du sang, diffère du plasma sanguin qui circule dans les vaisseaux de l'animal et qui sert d'aliment au streptocoque inoculé. Cette différence porte, comme nous le savons, principalement sur la présence de la microcytase (alexine bactéricide) dans du sérum, et sur son absence dans du plasma, ce qui tient dans le premier cas à la destruction des leucocytes, et dans le deuxième, à leur intégrité.

Mais on peut jusqu'à un certain degré remédier à cet inconvénient. La préparation du plasma exigeant des soins assez

minutieux, nous avons cru pouvoir nous rapprocher des conditions naturelles en détruisant la microcytase, par le chauffage du sérum à 55° pendant une demi-heure.

Et en réalité, quand on compare l'effet hémolytique de la streptocolysine obtenue, d'une part, avec du sérum non chauffé et, d'autre part, avec du sérum préalablement chauffé, on voit que la différence est des plus manifestes en faveur de ce dernier.

L'emploi des sérums chauffés présente en plus cet avantage que l'on n'a pas à compter avec l'action globulicide propre des sérums, lorsqu'ils ne sont pas privés de leur cytase (macrocytase ou alexine globulicide).

Tous les sérums ne se prêtent pas au même degré au but que nous poursuivons; de beaucoup le meilleur, sous ce rapport, est celui de lapin; le sérum humain et le sérum de mouton viennent en second lieu; celui de bouc n'est pas mauvais; quant aux sérums de bœuf et de cheval, ils présentent certains inconvénients sur lesquels nous reviendrons à propos de la fitration.

Une fois le milieu préparé, il reste à faire l'ensemencement, en choisissant un bon *microbe*.

Une assez longue expérience nous a appris que, pour se mettre à l'abri des échecs, il est important que le streptocoque à ensemencer vienne directement de l'organisme animal, et qu'il n'ait pas séjourné auparavant dans des cultures artificielles; nous serons même plus conforme à la réalité en disant qu'*il est essentiel que le streptocoque vienne directement d'un lapin dont il a hémolysé le sang*[1].

En pratique, nous procédons ainsi : la veille de l'ensemencement, nous injectons à un lapin, sous la peau, plusieurs gouttes de culture jeune en bouillon-ascite; 18-24 heures après, le lapin meurt; on fait l'autopsie aussitôt après, et le sang du cœur, *lorsqu'il est dissous*, est directement ensemencé dans des tubes contenant du sérum de lapin chauffé à 55°; on y laisse couler 1 ou 2 gouttes de sang dissous afin d'enrichir en même temps le milieu en hémoglobine; puis on porte les tubes à l'étuve à 37°.

Il est utile d'être prévenu que dans certains cas le lapin meurt du streptocoque, n'ayant pas son sang dissous; alors deux

1. Dans ce cas nous avons utilisé, pour l'ensemencement, le sang provenant d'un lapin autopsié depuis 5 jours et conservé dans une ampoule scellée; l'hémolysine ainsi obtenue fut assez active.

cas peuvent se présenter : ou le sang finit par se dissoudre au bout de quelques heures, ou bien il ne se dissout plus du tout, et ceci arrive surtout lorsqu'on injecte beaucoup trop de microbes sous la peau et, très souvent, lorsque, pour hâter la mort, on injecte, et à tort, le streptocoque dans la veine de l'oreille.

Dans ces cas, le sang du lapin n'étant pas hémolysé, il est inutile de faire des ensemencements et de pousser l'opération plus loin ; on perdra son temps, car ce streptocoque ne sécrétera pas son hémolysine.

Heureusement, ces cas sont exceptionnels en dehors des circonstances que nous venons d'indiquer. En règle générale, si on suit nos indications, on constate, en pratiquant l'autopsie du lapin, que le sang du cœur est complètement transparent, et dans ces conditions on est sûr, en l'ensemençant dans du sérum chauffé, d'obtenir une streptocolysine très active.

Portés à l'étuve, les tubes ensemencés se troublent rapidement ; déjà après 4-5 heures la culture est très abondante et elle atteint son maximum en 8 heures environ ; nous les laissons encore pendant 8 à 10 heures à l'étuve, après quoi on passe à la filtration.

Tous ceux qui ont eu à filtrer des sérums savent que c'est une opération souvent laborieuse ; il y a des sérums qui refusent complètement de passer à travers certaines bougies ; il y en a qui commencent à bien filtrer, puis la filtration se ralentit pour cesser au bout de quelques minutes.

Pour faciliter la filtration de nos cultures, nous avions toujours l'habitude de les diluer d'un volume égal d'eau physiologique à 7,5 0/00. Dans ces conditions, même les sérums les plus réfractaires passent.

La rapidité avec laquelle un sérum filtre est un facteur important. Nous avons remarqué, en opérant sur diverses espèces de sérums et en les étudiant comparativement, que, d'une manière générale, plus un sérum filtre facilement, mieux il vaut au point de vue de son pouvoir hémolytique ; peut-être la substance active est-elle retenue par les pores du filtre.

Toujours est-il que le sérum de lapin qui, dilué de son volume d'eau physiologique, passe très vite par la bougie Chamberland, donne toujours une excellente hémolysine ; nous pou-

vons en dire presque autant du sérum humain : ceux de bouc et de mouton filtrent moins bien : aussi donnent-ils une hémolysine inférieure : quant aux sérums de bœuf et de cheval, qui traversent difficilement la bougie, ils fournissent une hémolysine tout à fait médiocre.

Si la rapidité de la filtration a de l'importance, elle n'est pas évidemment seule à influer sur la qualité de la streptocolysine. Ainsi, la richesse de la culture, qui est variable selon les sérums, doit jouer un rôle non moins important.

Le streptocoque pousse le mieux et le plus rapidement dans du sérum de lapin, ce qui est du reste compréhensible, puisqu'il vient directement du sang de lapin. La culture est notablement moins abondante et plus lente à se faire dans du sérum de mouton, chauffé, et ainsi de suite.

Il y a donc grand compte à tenir, en faisant le choix du milieu de culture, de la rapidité avec laquelle tel ou tel sérum passe à travers le filtre, et de la facilité avec laquelle le microbe s'y développe.

*
* *

Nous venons de remarquer que l'hémolysine de beaucoup la meilleure est celle qui est fournie par le sérum de lapin. Mais il y a des cas où on a besoin de grandes quantités d'hémolysine, lorsqu'il s'agit, par exemple, d'immuniser des animaux de grande taille ; on est donc obligé dans ces cas de sacrifier pour chaque opération plusieurs lapins à la fois.

Or, il y a un moyen assez pratique d'éviter cela ; ce moyen repose sur l'observation suivante :

Lorsqu'on ajoute à du sérum de mouton, par exemple, qui à lui seul est un milieu de culture très médiocre pour le streptocoque, un peu de sérum de lapin (1/4 environ), on obtient une culture presque aussi abondante, et à la suite une hémolysine presque aussi active que si l'on avait ensemencé le streptocoque dans du sérum de lapin seul. Comme il est facile de se procurer de grandes quantités de sérum de mouton, cela permet de faire une bonne économie de temps et de lapins.

Ce que nous venons de dire pour le sérum de mouton est également applicable à d'autres sérums (bouc, bœuf, cheval), lorsqu'ils sont additionnés du sérum de lapin.

Résumons-nous. Pour préparer la streptocolysine, on commence par injecter à un lapin, sous la peau, plusieurs gouttes de culture de streptocoque de 24 heures en bouillon-ascite; le lendemain, dès que le lapin est mort, et après s'être assuré que le sang est dissous, on prélève avec une pipette, dans le cœur, 2-3 gouttes de sang avec lequel on ensemence un tube contenant du sérum de lapin seul, ou un mélange du sérum de lapin et de sérum de mouton ou de chèvre. On porte le tube à l'étuve pour 24 heures; puis, après avoir étendu la culture de son volume d'eau physiologique, on filtre le mélange à travers la bougie Chamberland.

Le liquide retiré après la filtration possède à un haut degré des propriétés hémolysantes dont il sera question plus loin.

Avant d'affirmer que l'on se trouve réellement en présence de l'hémolysine streptococcique, ou streptocolysine, il était prudent de s'assurer que l'effet hémolytique observé à la suite des opérations ci-dessus est bien dû à la sécrétion du microbe et non pas à autre chose ; car on peut se demander si un sérum animal, même normal, ne subit pas au cours de la filtration un appauvrissement en substances solides tel, qu'il entraînerait un changement de titre isotonique. Cette supposition était assez grave pour que nous nous empressions de la vérifier.

Deux échantillons de sérum de lapin, un normal, l'autre chauffé à 55°, ont été à cet effet soumis à la filtration dans les mêmes conditions que plus haut (après dilution avec volume égal d'eau physiologique) ; puis les deux filtrats ont été examinés au point de vue de leur pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges de lapin, de cobaye et de bœuf.

Or, les résultats en furent nettement négatifs ; les sérums neufs, chauffé ou non chauffé, n'hémolysent pas les hématies davantage après la filtration qu'avant.

Une dernière précaution à prendre, avant d'aborder l'étude de la streptocolysine, est de vérifier si la bougie a bien fonctionné pendant toute l'opération, c'est-à-dire si, par hasard, elle n'a pas laissé pénétrer quelques streptocoques dans le filtrat, ce

dont il faut toujours avoir soin de s'assurer en ensemençant quelques gouttes de filtrat dans du bouillon-ascite.

II

On essaie le pouvoir hémolytique de la streptocolysine exactement comme s'il s'agissait d'une hémolysine cellulaire; inutile donc d'y insister.

Pour se faire une idée de l'intensité du phénomène, il suffirait de citer quelques chiffres : ainsi 24 gouttes de filtrat obtenu avec du sérum de lapin (par conséquent 12 gouttes de streptocolysine non diluée) dissolvent une goutte de sang défibriné de lapin en 2 heures, à l'étuve; la même dose de filtrat, mise en contact avec 6 gouttes de même sang, amène la dissolution complète en 7-8 heures. On voit donc que nous avons affaire à une action hémolytique très énergique.

Quand on ne cherche pas à déterminer le titre hémolytique absolu d'une streptocolysine, il est préférable d'opérer sur des globules émulsionnés dans de l'eau physiologique [1] : l'effet hémolytique se manifeste alors en très peu de temps : ceci est indiqué dans des expériences comme les nôtres, faites surtout en vue d'étudier comparativement des phénomènes hémolytiques dans différentes conditions de milieu et de température.

Ce qui distingue l'hémolysine sécrétée par le streptocoque des hémolysines cellulaires, et ce qui la rapproche des autres bactériolysines, c'est l'absence de spécificité vis-à-vis de l'espèce de globules rouges.

La streptocolysine dissout non seulement les globules rouges de lapin, mais encore ceux de l'homme, de cobaye, de mouton, de bœuf, de cheval, de chien.

Elle ne dissout pas tous ces globules avec la même facilité; ainsi, alors que la destruction des hématies de cobaye ou de l'homme exige une heure, celle des globules de cheval ou de bœuf en demande deux ou même plus; en règle générale, ce n'est là qu'une question de temps.

Mais il existe une exception curieuse à cette règle : il y a des globules qui se comportent différemment suivant la nature de

1. Dans toutes nos expériences, l'eau physiologique est à 7,5 0/00.

sérum qui a servi pour la préparation de la streptocolysine; certains globules se dissolvent bien dans un sérum et ne dissolvent pas du tout dans un autre, bien que le streptocoque ayant servi à ensemencer ces deux sérums soit le même.

Nous reviendrons encore sur ce point.

Le lavage préalable du sang à l'eau physiologique, fait dans le but de le débarrasser du sérum, n'exerce pas une action appréciable sur la rapidité de l'hémolyse.

La présence des antitoxines naturelles dans des sérums normaux, signalée par plusieurs savants pour les bactériolysines et par nous-même[1] pour ce qui concerne les hémolysines cellulaires, nous a fait rechercher s'il n'en serait pas de même pour l'antistreptocolysine.

Or, l'expérience nous a montré que la plupart des sérums de laboratoire (mouton, lapin, chèvre, cobaye, homme), additionnés même à fortes doses, sont incapables d'empêcher l'hémolyse. Certes, l'addition de ces sérums retarde plus ou moins la dissolution de l'hémoglobine; mais il n'y a pas lieu d'invoquer pour cela une action antihémolytique dans le sens propre du mot. Seul le sérum de cheval, ajouté à dose double de celle d'hémolysine, peut presque empêcher complètement l'hémolyse; il y aurait peut-être là un rapprochement à faire avec ce qui a été observé, non seulement pour certaines bactériolysines, mais encore pour les toxines diphtérique et tétanique.

Nous avons vu que l'hémolysine streptococcique agit indifféremment, d'une manière générale, sur tous les globules rouges, sans manifester cette spécificité qui est si caractéristique pour les hémolysines cellulaires.

Elle présente en plus une autre particularité qui la sépare non seulement des hémolysines cellulaires, mais encore des autres hémolysines microbiennes: c'est la manière dont elle se comporte vis-à-vis des températures élevées.

1. Ces *Annales*, 1901, octobre. Dans cet article, qui avait pour sujet de démontrer la présence d'antihémolysines *naturelles* dans les sérums des *animaux neufs*, nous avons omis de citer MM. Ehrlich et Morgenroth. Dans un de leurs mémoires sur les hémolysines (*Berl. klin. Wochens*, 1900, 21 mai), ils se sont demandés si le *sérum des chèvres injectées* avec du sang de chèvre ne contenait pas d'anti-autohémolysine; n'ayant pas réussi à révéler la présence de celle-ci, ils ajoutent qu'ils n'en concluent pas à son absence, mais qu'ils espèrent réussir dès qu'ils auront en main une hémolysine appropriée.

La streptocolysine résiste bien à 55°-56°; alors que la staphylolysine, par exemple, de MM. Neisser et Wechsberg[1], est déjà atténuée à 48° et complètement détruite à 56° après 20 minutes de chauffage, la streptocolysine chauffée pendant une demi-heure à 55°-56° n'est presque pas entamée; on constate un léger retard, comparativement avec la streptocolysine non chauffée, mais ce retard est insignifiant. Même à 65°, notre hémolysine n'est pas sérieusement atteinte; ce n'est que par le chauffage à 70° pendant 2 heures que l'on parvient à enlever à la streptocolysine ses propriétés hémolysantes.

Par contre, la streptocolysine est sensible à l'*action prolongée* de la température, même pas très élevée.

Ainsi, si on la chauffe à 55° pendant 10 heures, on finit par la priver entièrement de son hémolysine.

Même, la température de l'étuve (37°) lui est funeste, si elle est prolongée. Nous avons eu l'occasion de constater qu'un filtrat, ayant séjourné pendant plusieurs jours à l'étuve à 37°, est devenu notablement moins actif que le même filtrat laissé à la température du laboratoire.

Mais même la température du laboratoire (15°-17°) exerce à la longue une action nettement nuisible sur l'activité de la streptocolysine. Il suffit d'examiner une hémolysine d'un titre déterminé à des intervalles rapprochés, tous les 2 jours, par exemple, pour s'apercevoir que son activité va en décroissant et assez vite. Au bout de 15 jours, elle est déjà très faible; après 20 jours, elle n'existe qu'à l'état de traces.

Faisons observer, en passant, que la streptocolysine, ayant perdu son pouvoir hémolytique, ne peut être réactivée ni par des sérums neufs, ni par une streptocolysine récemment préparée.

C'est l'influence de la température sur la streptocolysine qui a déterminé, en partie, le choix du procédé adopté pour la préparation de l'hémolysine en question. En cherchant à réaliser les meilleures conditions au point de vue de la force hémolytique, nous nous sommes demandé si des cultures ayant séjourné plusieurs jours à l'étuve ne conviendraient encore mieux à notre but. Les résultats des expériences faites dans cet ordre d'idées se montrèrent tout à fait négatifs : alors que le filtrat

1. *Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten*, 1901.

d'une culture de 24 heures se montra très actif, celui qui provenait de la même culture, mais vieille de 3 jours, fut notablement moins hémolytique, et le filtrat de cette même culture, après 5 jours, fut complètement dénué de propriétés dissolvantes.

En présence de ces faits, deux hypothèses pouvaient se présenter; la disparition de l'hémolysine pouvait tenir à ce que le filtrat était soumis pendant plusieurs jours d'une façon continue à la température de 37°, ou bien au fait que les cultures vieilles de 3 et surtout de 5 jours ne se prêtent plus à l'isolement de l'hémolysine.

Des expériences entreprises à ce sujet ont montré que, bien que le séjour à l'étuve atténue à un degré très appréciable la streptocolysine, débarrassée des corps microbiens, cette atténuation ne va pas cependant jusqu'à la destruction complète; il faut donc attribuer cette dernière surtout aux modifications que subit la culture en vieillissant; la streptocolysine formée dans les premières 24 heures est probablement détruite par le streptocoque ou par ses autres produits de sécrétion.

Nous venons d'observer que, pour peu que la température soit un peu élevée, l'action de la streptocolysine s'atténue à la longue; mais il faut noter que c'est en même temps à la température de l'étuve (37°) qu'elle dissout les globules rouges avec l'intensité maximale. Ainsi, si une dose déterminée d'hémolysine dissout 1 c. c. de sang en 2 heures, à l'étuve, il faut, pour obtenir la dissolution dans les mêmes conditions, au moins 10 heures à la température du laboratoire (15°).

L'action empêchante du froid est beaucoup plus manifeste pour la streptocolysine que pour les hémolysines cellulaires.

A côté du froid, nous devons signaler un autre facteur qui gêne également l'hémolyse : c'est la présence des sels. Une forte dose de chlorure de sodium, ajoutée à la streptocolysine, peut retarder son action, sans cependant l'empêcher définitivement.

La dialyse dans l'eau physiologique à 7,5 0/0 ne lui fait subir aucune modification; la streptocolysine ne traverse pas la membrane du dialyseur, et les deux liquides des vases extérieur et intérieur, retirés après 24 et 48 heures de dialyse, gardent respectivement toutes leurs propriétés primitives.

*
* *

Jusqu'ici nous avons traité des propriétés qui ont été communes à tous les échantillons de streptocolysine que nous avons eus en main. *A priori* on ne devait pas s'attendre à trouver des différences individuelles, étant donné que le microbe était toujours le même; le milieu de culture était aussi toujours le même, en ce sens que c'était toujours du sérum chauffé : mais il provenait tantôt d'une espèce animale, tantôt d'une autre.

Or, en réalité, les phénomènes sont plus compliqués. En employant différents sérums, on obtient des hémolysines qui diffèrent non seulement au point de vue de leur activité, c'est-à-dire au point de vue quantitatif, mais encore au point de vue qualitatif. C'est là un phénomène très curieux sur lequel nous voudrions appeler l'attention. Voici quelques exemples.

La streptocolysine préparée avec du *sérum de bouc*, chauffé, dissout bien les globules rouges de cobaye, de lapin et de l'homme; mais elle ne dissout pas les globules de bouc [1], de mouton, d'oie et de poule [2].

La streptocolysine préparée avec du *sérum de bœuf*, chauffé, se rapproche de la précédente; comme la première, elle dissout facilement les hématies de cobaye, de lapin et de l'homme; comme la précédente elle ne dissout pas du tout les globules de bouc, ni ceux de poule; mais elle dissout, quoique difficilement, les globules de mouton et aussi un peu ceux d'oie.

A côté de ces deux streptocolysines agissant à peu près de la même façon, nous pouvons en citer deux autres, à savoir celles qui sont préparées avec du sérum humain et avec du sérum de mouton, qui agissent différemment.

Ainsi, la streptocolysine préparée avec du *sérum de mouton*, chauffé, dissout, comme celles indiquées plus haut, les globules de cobaye, de lapin et de l'homme; mais, en plus, elle dissout très bien les globules de mouton, et plus difficilement ceux de bouc; les globules de poule ne sont presque pas dissous : ceux d'oie finissent à la longue par se dissoudre en grande partie.

La streptocolysine préparée avec du *sérum humain*, chauffé,

1. L'effet est le même, qu'il s'agisse des globules du même bouc qui a fourni le sérum pour le milieu de culture, ou des globules d'un autre bouc.

2. D'une façon générale, les globules d'oie et de poule se montrent très résistants vis-à-vis des streptocolysines.

dissout les globules de cobaye, de lapin et de l'homme, et aussi bien et aussi vite, de bouc et de mouton; par contre, elle ne dissout ni les globules d'oie ni ceux de poule.

Il s'ensuit donc qu'en réalité il n'existe pas une seule streptocolysine, mais bien plusieurs, le streptocoque étant capable de se comporter différemment selon le milieu dans lequel on le fait pousser. Ce fait, qui a pu être révélé grâce à la sensibilité extrême du réactif employé, — les globules rouges, — doit être, croyons-nous, pris en considération lorsqu'on étudie les toxines microbiennes en général. Ce qui a été constaté pour le streptocoque peut être vrai pour tous les microbes, c'est-à-dire que le milieu de culture peut influer non seulement sur l'abondance de la toxine sécrétée, mais encore sur la nature même de la toxine, qui peut varier d'un milieu à un autre, ces milieux fussent-ils même très voisins par leur constitution chimique.

*
* *

Dès que nous avons eu en main l'hémolysine, nous nous sommes mis à préparer l'antihémolysine. Les lapins supportent bien des doses très fortes d'hémolysine : 20 et 30 c. c. sous la peau, dans le péritoine ou dans la veine.

Contrairement aux hémolysines cellulaires et à la staphylotoxine [1], celle qui est sécrétée par le streptocoque n'est pas du tout ou n'est qu'extrêmement peu toxique. Il est inutile de rapporter ici les nombreux essais tentés sur des lapins et des moutons, dans le but d'obtenir l'antitoxine. Nous avons essayé la voie sous-cutanée, intraveineuse, intrapéritonéale, et toujours avec le même résultat négatif. Nous faisons cependant quelques réserves sur les injections sous-cutanées des doses massives d'hémolysine chez les lapins, car dans quelques cas nous avons observé une propriété antihémolytique, si toutefois cette dernière n'était pas due à une particularité individuelle du sérum.

Pour ce qui concerne le mouton, ni les injections intraveineuses ni les injections sous-cutanées n'ont jamais pu donner naissance à la moindre trace d'antihémolysine.

Dans tous nos essais d'immunisation, nous employions une hémolysine active vis-à-vis des globules de mouton et de lapin, sans parler d'autres espèces de globules. Elle était pré-

1. Neisser et Wechsberg, *loc. cit.*

parée avec un mélange des sérums chauffés de lapin et de mouton.

Le seul fait que l'on observait dans ces essais, c'était la formation du précipité de Tchistowitch aussitôt que l'on faisait le mélange de l'hémolysine avec du sérum des lapins vaccinés.

Nous n'avons jamais constaté un précipité aussi abondant que celui que l'on obtient avec du sérum des lapins injectés par la voie sanguine. Son apparition était presque instantanée, et il était si abondant qu'il semblait occuper à lui seul tout le tube.

Le sérum de lapins injectés par la voie intrapéritonéale avec des doses d'hémolysine égales et également espacées donnait un précipité beaucoup moins volumineux.

Les essais d'immunisation n'ayant pas jusqu'à présent donné des résultats favorables, il nous reste à chercher de nouveaux procédés pour obtenir l'antistreptocolysine.

CONCLUSIONS

Dans certaines conditions bien déterminées, le streptocoque sécrète une substance de nature probablement diastasique, qui possède des propriétés hémolytiques très prononcées.

Cette hémolysine streptococcique dissout les globules rouges de la plupart des animaux de laboratoire.

L'action hémolytique s'opère lentement à la température de la chambre ; l'optimum de son action est à 37°.

L'hémolysine streptococcique résiste à 55° pendant une demi-heure ; chauffée même à 65° pendant une demi-heure, elle ne perd pas ses propriétés hémolytiques ; on constate seulement dans ces cas un retard dans l'apparition de l'hémolyse.

La disparition complète et définitive de l'effet hémolytique survient à la suite d'un chauffage soit pendant 2 heures à 70°, soit pendant 10 heures à 55°.

L'hémolysine streptococcique ne passe pas à travers la membrane du dialyseur.

Elle peut acquérir des propriétés individuelles suivant le milieu dans lequel elle s'est formée.

Elle n'est pas toxique pour les animaux (mouton, lapin).

SUR L'ÉTAT DE LA CYTASE DANS LE PLASMA DES ANIMAUX NORMAUX ET DES ORGANISMES VACCINÉS CONTRE LE VIBRION CHOLÉRIQUE

PAR C. LEVADITI (DE BUCAREST)

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Le progrès accompli dans le domaine de l'immunité antimicrobienne et anticellulaire est, à l'heure présente, considérable. Les recherches de Bordet, d'Ehrlich et Morgenroth, de Metchnikoff et ses élèves, ont permis de pénétrer jusque dans ses plus intimes détails le mécanisme qui préside à l'action des bactériolysines et des cytotoxines spécifiques. On sait que les immun-sérums agissent au moyen de deux principes bien définis, le *complément ou cytase* et le *corps intermédiaire* ou *sensibilisatrice*, et que la cytolyse, comme la bactériolyse, est conditionnée par la fixation de ce corps intermédiaire sur l'élément cellulaire ou microbien. On reconnaît, de plus, que parmi ces substances, seule la sensibilisatrice est douée de propriétés spécifiques et caractérise l'immun-sérum; au contraire le complément, essentiellement non spécifique, existe chez des animaux n'ayant subi préalablement aucun traitement.

Il est important de préciser les rapports qui relien ces substances aux éléments cellulaires. Une telle étude est éminemment propre à nous renseigner sur le mécanisme qui domine la genèse des anticorps; de plus, elle permet de voir en quelle mesure les cellules prennent part, d'une manière directe ou au moyen de leurs sécrétions, à la lutte contre les agents figurés et leurs produits solubles. M. Metchnikoff nous ayant accordé son précieux appui, nous avons pensé bien faire d'entreprendre, sous sa direction, une série de recherches dirigées dans cette voie. Ces recherches ont pour but de préciser si *le complément, capable de réactiver la sensibilisatrice anticholérique, existe à l'état de liberté dans le plasma des animaux normaux ou activement immunisés, ou bien si ce complément, ordinairement ren-*

fermé dans le protoplasma leucocytaire, n'est livré aux humeurs qu'après la mort des globules blancs.

Nous n'entreprendrons pas ici l'historique complet de cette question : il est amplement fait dans un travail de Gengou, paru récemment dans ces *Annales*[1]. D'ailleurs, la plupart des auteurs qui ont essayé de préciser les relations entre les leucocytes et les propriétés bactériolytiques des humeurs (Buchner, Denys et ses élèves), ont eu en vue l'*alexine* ou la substance bactéricide des sérums normaux, et non pas le complément lui-même, tel qu'il peut être mis en évidence au moyen des sérums préalablement inactivés. Pourtant les recherches de Metchnikoff[2], de Salimbeni[3], de Cantacuzène[4], montrant que les vibrions cholériques, introduits sous la peau des animaux vaccinés, ne subissent pas la transformation granulaire décrite par Pfeiffer, les constatations de Bordet[5] concernant les propriétés bactéricides des liquides transudatifs provenant d'organismes activement immunisés, enfin l'observation de Cantacuzène, à savoir que chez les oies atteintes de spirillose, les microorganismes ne subissent des modifications extracellulaires qu'après la coagulation du sang, sont, à notre avis, trop démonstratives, pour ne pas être considérées comme autant de preuves en faveur de la non-liberté du complément dans le plasma.

Pour ce qui concerne la substance bactéricide des sérums normaux, les recherches récentes de Gengou, d'après lesquelles le plasma, pauvre en leucocytes, est infiniment moins actif que le sérum, sont, assurément, les mieux faites dans cet ordre d'idées. Néanmoins, si l'on se place au point de vue qui nous intéresse spécialement, on peut adresser à ces recherches les mêmes objections qu'aux conclusions de Buchner, de Denys, etc., à savoir qu'elles ne tiennent pas assez compte de la *complexité* des sérums bactéricides normaux. Pour ce motif, ces expériences ne démontrent pas d'une manière absolue que les différences constatées

1. Gengou, Contrib. à l'étude de l'origine de l'alexine des sérums normaux, ces *Annales*, février 1901, et même titre, 1re partie, ces *Annales*, avril 1901.

2. Metchnikoff, Etudes sur l'immunité, 6me mémoire, ces *Annales*, 1895.

3. Salimbeni, La destruction des microbes dans le tissu sous-cutané des animaux hypervaccinés, ces *Annales*, 1898.

4. Cantacuzène, Nouvelles recherches sur le mode de destruction des vibrions dans l'organisme, ces *Annales*, 1898.

5. Bordet, Contrib. à l'étude du sérum chez les animaux vaccinés, *Ann. de la Soc. royale des sc. médicales et naturelles de Bruxelles*, 1895, t. IV.

entre le pouvoir microbicide du plasma et du sérum *résident exclusivement dans l'absence du complément libre* dans le premier de ces liquides. Il serait en effet fort possible que les leucocytes mettent en liberté non seulement le complément, mais aussi une *sensibilisatrice normale*, ce qui compliquerait beaucoup l'influence des globules blancs sur les propriétés bactéricides des humeurs normales.

Pour résoudre le problème que nous nous sommes posé, on peut s'adresser soit à des organismes normaux, soit à des animaux préalablement vaccinés. Seulement, dans le premier cas, il faut commencer par étudier le mécanisme qui préside à l'action des sérums bactéricides normaux, voir si, comme le veulent Pfeiffer et Moxter, ces sérums agissent suivant le procédé utilisé par les immun-sérums, c'est à-dire au moyen du complément et du corps intermédiaire. Cette question une fois éclairée, il devient évident que toute conclusion, concernant l'état du complément chez les animaux neufs, ne saura plus être atteinte par l'objection que l'on pourrait adresser aux recherches de Gengou.

Aussi avons-nous eu soin de commencer notre étude par l'analyse de ces sérums normaux. A cette fin, nous avons choisi comme sujet d'expérience le cobaye et le rat, comme microbe le vibrion cholérique (variété Cassino). Déjà en 1895, Pfeiffer[1] avait constaté que le *sérum normal* de chèvre, préalablement inactivé par un chauffage à 60°, est capable de dissoudre les vibrions cholériques, si l'on a soin de l'introduire, en même temps que ces vibrions, dans la cavité péritonéale d'un cobaye neuf. Cet auteur établissait ainsi une analogie étroite entre l'immun-sérum et le sérum normal, et attribuait aux humeurs bactéricides des animaux neufs une constitution voisine de celle des sérums préventifs. Denys et Leclef, Hahn[2], en se servant soit de sérums complémentaires, soit de leucocytes, ne réussirent pourtant pas à rendre bactéricide un sérum normal, préalablement inactivé; au contraire, entre les mains de Laschtschenko[3], ces globules blancs se montrèrent capables de réactiver un tel sérum.

1. Pfeiffer, *Zf. für Hyg.*, 1895.
2. Cités d'après Moxter.
3. Laschtschenko, *Münchener med. Woch*, 1899, p. 475.

Moxter[1] a fait une étude plus détaillée de la question. Il trouve que les mélanges constitués par *deux substances inactives*, l'exsudat péritonéal préalablement dilué, provenant des cobayes neufs et le sérum inactivé du même animal, exercent une action bactériolytique manifeste sur les vibrions cholériques ; cette action peut parfois dépasser celle du sérum frais. Moxter, tout en attribuant aux humeurs bactéricides normales une constitution complexe (complément + sensibilisatrice), ne peut établir aucune relation entre les globules blancs de l'exsudat péritonéal et le pouvoir réactivant de cet exsudat. Il dit, en effet : « *Es ist jedoch keine Beziehung derselben zu den Leukocyten nachweisbar* ». Si la première affirmation de Moxter demande une vérification expérimentale, la dernière peut être mise en doute, rien qu'en analysant quelques-unes des expériences publiées par l'auteur lui-même. En effet, pour conclure que l'on ne peut pas apprécier le rôle joué par les leucocytes, dans ses recherches de réactivation, Moxter s'appuie sur le fait que le pouvoir bactéricide d'un sérum préalablement inactivé et mis en contact avec des *globules blancs vivants est nul*, quoique ces globules offrent des manifestations vitales jusqu'à la fin de l'expérience. Or, comme on le verra au cours de ce travail, et comme il ressort des recherches antérieures de M. Metchnikoff, justement les leucocytes ne mettent en liberté le complément qu'ils renferment qu'après avoir subi des modifications régressives. Donc, rien d'étonnant si dans les expériences précitées de Moxter ces leucocytes, en plein état de vitalité, n'ont pas été capables de rendre bactéricide le sérum préalablement inactivé.

Que les sérums bactériolytiques normaux agissent au moyen de deux substances, le complément et la sensibilisatrice, c'est ce qui semble ressortir aussi d'une expérience déjà ancienne de Bordet, d'après laquelle le sérum inactivé de cheval normal rend les vibrions cholériques sensibles à l'action lytique de l'alexine du cobaye. Rappelons, enfin, que pour ce qui concerne les sérums hémolytiques, le fait a été démontré d'une manière éclatante par Ehrlich et Morgenroth[2], qui décèlent dans certaines hémolysines normales la présence d'un corps intermédiaire et d'un addiment.

1. Moxter, Ueber die Wirkungsweise der bacterienauflösenden Substanzen der Tierischen Säfte, *Cbt. für Bakt.*, 1899, B. 26.

2. Ehrlich et Morgenroth, Ueber Hämolysine, IIe Mitt. *Berl. kl. Woch.*, 1900.

Dans nos recherches, nous avons employé, comme substance réactivante, l'*extrait leucocytaire* obtenu en soumettant l'exsudat péritonéal (cellules et liquide exsudatif) du cobaye neuf, tout d'abord à une courte congélation, ensuite pendant plusieurs heures à la température du thermostat (méthode de Buchner). L'exsudat, obtenu en injectant dans la cavité péritonéale de plusieurs animaux une suspension d'aleurone dans du bouillon, était préalablement dilué dans une quantité variable d'eau physiologique. Après le séjour au thermostat, on séparait les cellules à l'aide de la force centrifuge, et on obtenait ainsi un liquide clair, riche en complément. Le sérum du cobaye neuf, préalablement maintenu pendant une heure à 56°, nous servait comme sensibilisatrice. Enfin, dans toutes nos expériences, nous avons employé le vibrion cholérique, dont la transformation granulaire plus ou moins rapide, plus ou moins complète, nous servait comme indicateur de l'activité bactériolytique recherchée.

Expérience I (6 avril). On éprouve l'action d'un sérum frais de cobaye neuf sur une émulsion de vibrions cholériques (culture sur gélose, âgée de 22 heures) dans du bouillon (0,05 g. culture pour 5 c. c. bouillon). Les mélanges de culture et de sérum sont maintenus pendant 1 heure au thermostat, et examinés en goutte pendante.

CULTURE	SÉRUM	EAU phys. à 0,8 0/0.	RÉSULTAT ap. 1 h. de séjour au thermostat.
0,5	1,0	0,5	+ + +
»	0,75	0,75	+ +
»	0,5	1,0	+ +
»	0,25	1,25	+
»	0	1,5	0

1. Dans cette expérience et dans celles qui suivent :
0 signifie *pas de transformation granulaire.*
+ — *trace* — —
+ + — *transformation granulaire faible.*
+ + + — — — *moyenne.*
+ + + + — — — *forte.*

On voit, d'après cette expérience, que le sérum frais de cobaye neuf réalise *in vitro* d'une manière appréciable, la transformation granulaire du vibrion Cassino.

L'extrait leucocytaire obtenu en traitant suivant la méthode décrite plus haut l'exsudat péritonéal de cobaye neuf, paraît jouir d'un pouvoir bactériolytique moins accentué que celui du sérum provenant du même animal; ce pouvoir devient égal à celui de ce sérum si l'on a soin d'expérimenter sur le rat. C'est ce que les expériences suivantes montrent clairement.

Expérience II (12 avril). L'exsudat péritonéal et le sérum frais de cobaye neuf ont été dilués de moitié, avec de l'eau physiologique.

CULTURE	SÉRUM NEUF	EXTRAIT	EAU physiolog.	RÉSULTAT ap. 1 h. de séjour au thermostat.
0,5	1,0	0	0,5	+ + +
»	0	1,0	0,5	+ +
»	0	0	1,5	0

Expérience III (17 avril). Un rat blanc reçoit dans le péritoine 3 c. c. de bouillon-aleurone. Après 22 heures, on trouve 1,2 c. c. d'exsudat riche en polynucléaires, que l'on dilue dans son volume d'eau physiologique. L'extrait obtenu à l'aide de cet exsudat est comparé à du sérum frais de rat normal, au même titre de dilution.

	CULTURE	SÉRUM	EXTRAIT	EAU physiolog.	RÉSULTAT après 1 heure de séjour au thermostat.
Sérum.	3	1	0	7	+ +
	3	3	0	5	+ ++
	3	5	0	3	+ + +
	3	8	0	0	+ + +
Extrait.	3	0	1	7	+ +
	3	0	3	5	+ + +
	3	0	5	3	+ + +
	3	0	8	0	+ + +
Témoin	3	0	0	8	0

Nous avons recherché ensuite si l'extrait leucocytaire employé dans les expériences précédentes est capable de réactiver un sérum neuf, préalablement maintenu pendant 1 heure à 56°. A cette fin, nous avons tout d'abord dilué cet extrait leucocytaire jusqu'à ce qu'il n'exerce plus d'action bactériolytique ; nous avons ensuite ajouté, au liquide ainsi rendu inactif, des quantités variables de sérum chauffé.

Expérience IV (18 avril). La dilution de l'exsudat est de 1 : 5. On emploie une émulsion vibrionnienne contenant une culture sur gélose, pour 5 c. c. bouillon (Cobaye).

	CULTURE	SÉRUM actif.	SÉRUM inactif.	EXTRAIT	EAU physiol.	RÉSULTAT après 1 h. de séjour au thermostat.
Sérum actif.	0,5	1,0	0	0	1,5	+ + +
	0,5	0,5	0	0	2,0	+ +
Sérum inactif.	0,5	0	1,0	0	1,5	0
Extrait.	0,5	0	0	1.0	1,5	0
Sérum inactif + extrait.	0,5	0	1.0	1,0	0,5	0
	0,5	0	0,5	1.0	1.0	0
	0,5	0	0,25	1,0	1,25	0
Témoin.	0,5	0	0	0	1.5	0

Cette expérience montre que dans le cas où l'extrait leucocytaire, *à force d'être fortement dilué*, ne réalise plus à lui seul le phénomène de Pfeiffer, cet extrait n'exerce aucune action sensible sur un sérum préalablement inactivé. Il n'en est pas de même lorsque la dilution est plus modérée. On voit alors que le pouvoir bactériolytique de cet extrait *s'exagère* sous l'influence du sérum chauffé.

Expérience V (12 avril). La dilution de l'exsudat est de 1 : 1 (Cobaye).

	CULTURE.	SÉRUM actif.	SÉRUM inactif.	EXTRAIT	EAU physiolog.	RÉSULTAT après 1 h. de séjour au thermostat.
Sérum actif.	0,5	0,5	0	0	1,0	+ + +
Sérum inactif.	0,5	0	0,5	0	1,0	0
Extrait.	0,5	0	0	1,0	1,0	+
Extrait + sérum inactif.	0,5 0,5	0 0	1,0 0,5	1,0 1,0	0 0,5	+ + + + + +
Témoin	0,5	0	0	0	1,0	0

L'exsudat péritonéal et le sérum de rat donnent des résultats comparables à ceux fournis par l'expérience précédente.

Cette première série d'expériences montrent que le sérum normal inactivé contient une substance capable d'exagérer d'une manière appréciable l'activité bactériolytique du complément renfermé dans l'extrait leucocytaire. Dans les expériences suivantes, nous avons recherché si les vibrions cholériques fixent cette *sensibilisatrice normale*.

Expérience VI (21 avril). L'exsudat péritonéal aleuronique de cobaye normal est dilué dans son volume d'eau physiologique ; il sert à préparer l'extrait leucocytaire. Le sérum de cobaye normal est inactivé à 56°, et divisé en deux portions, *S* et *S'* : *S* est employé tel quel ; *S'*, préalablement mis en contact avec des vibrions cholériques, est maintenu au thermostat pendant 2 heures. On sépare ensuite les vibrions à l'aide de la force centrifuge. (Voir à la page suivante.)

Le sérum neuf inactivé, préalablement maintenu en contact avec des vibrions cholériques, devient manifestement moins riche en sensibilisatrice. Il est donc à admettre que ces vibrions ont fixé une partie de la sensibilisatrice normale renfermée dans ce sérum. S'il en est ainsi, on doit constater que ces vibrions,

	CULTURE	SÉRUM S	SÉRUM S'	EXTRAIT	EAU physiolog.	RÉSULTAT après 1 h. de séjour au thermostat.
S	4	8	0	0	10	0
S + extrait	4	8	0	1	9	+
	4	8	0	3	7	+
	4	8	0	6	4	+ +
	4	8	0	10	0	+ + +
S' + extrait.	4	0	8	1	9	0
	4	0	8	3	7	+
	4	0	8	6	4	+
	4	0	8	10	0	+
Extrait seul.	4	0	0	1	17	0
	4	0	0	3	15	0
	4	0	0	6	12	0
	4	0	0	10	8	+
Témoin.	2	0	0	0	18	0

ainsi sensibilisés, doivent subir plus facilement l'action bactériolytique de l'extrait leucocytaire. C'est ce que montre, en effet, l'expérience suivante :

Expérience VII (13 mai). On emploie le sérum de cobaye normal (*Sn*) et le sérum provenant d'un cobaye immunisé contre le vibrion Cassino (*Si*); ces deux sérums ont été préalablement inactivés. Une culture vibrionienne sur gélose, âgée de 23 heures, est répartie en trois portions, *a*, *b* et *c*. De ces trois portions, *a* est mis en contact avec *Sn*, *b* avec *Si*, et *c* avec du bouillon; on maintient le tout pendant 3 heures à la température de la chambre. Les vibrions sont ensuite séparés par la force centrifuge et lavés à l'eau physiologique.

	CULTURE	EXTRAIT	EAU physiolog.	RÉSULTAT ap. 1 h. de séjour au thermostat.
Vibrions sensibilisés avec S_1.	3	1	11	+ + +
	3	3	9	Complet.
	3	5	7	Complet.
	3	10	2	Complet.
Vibrions sensibilisés avec S_n.	3	1	11	0
	3	3	9	+ +
	3	5	7	+ + +
	3	10	2	+ + + +
Vibrions normaux.	3	1	11	0
	3	3	9	+
	3	5	7	+ +
	3	10	2	+ +

On voit, d'après cette expérience, que la sensibilisatrice renfermée dans le sérum neuf se fixe sur les vibrions cholériques. Pourtant, il est à admettre que cette fixation s'opère d'une manière moins intense que celle de *l'immunkörper* des sérums préventifs. En effet, dans deux de nos expériences, les vibrions préalablement mis en contact avec le sérum neuf inactivé n'ont pas différé sensiblement des vibrions puisés directement dans le tube de culture.

Ces recherches sont assez concordantes pour nous autoriser à admettre, avec Pfeiffer et Moxter, que le *pouvoir bactériolytique des sérums normaux est dû à l'intervention du complément et d'une sensibilisatrice normale*. Évidemment, les résultats fournis par ces expériences ne nous permettent pas de préciser si cette sensibilisatrice normale est identique à celle de l'immun-sérum, et si les réactions humorales que l'on observe dans l'immunité acquise ne sont qu'une exagération de ce que l'on trouve à l'état d'ébauche chez les animaux normaux. Quoi qu'il en soit, ces faits sont assez démonstratifs pour constituer le point de départ nécessaire à l'analyse des phénomènes exposés ci-dessous.

*
* *

Que se passe-t-il quand, *in vitro*, on met en contact des *vibrions cholériques avec de l'exsudat péritonéal frais du cobaye neuf?* Disposons l'expérience en nous servant du procédé employé déjà en 1895 par Bordet (phagocytose *in vitro*) et suivons pas à pas les phénomènes qui ont lieu dans ces conditions.

Expérience VIII (8 juin). — Exsudat péritonéal riche en polynucléaires, obtenu chez le cobaye à l'aide d'une injection de bouillon pratiquée 20 heures avant l'expérience; émulsion de vibrions dans de l'eau physiologique. On fait quatre mélanges, renfermant chacun une partie d'exsudat, une partie de culture et une partie d'eau physiologique; on dispose ces mélanges dans des chambres humides, à la température du thermostat. Après 5, 20, 40 et 60 minutes, on fait des préparations sur lame et l'on colore à la thionine phéniquée. Voici ce que l'on observe :

Après 5 minutes. — On ne décèle pas encore de signes de phagocytose. Les leucocytes polynucléaires sont pour la plupart entourés de vibrions ayant conservé leur forme et leur colorabilité normales. Quelques globules blancs offrent des signes de dégénérescence; leur noyau fragmenté apparaît sous la forme de grains ronds, fortement colorés, leur protoplasma est homogène. Ces globules blancs morts sont extrêmement rares.

Après 20 minutes. — Un grand nombre de leucocytes polynucléaires renferment des vibrions. Ces vibrions phagocytés sont en partie transformés en granulations de Pfeiffer; on voit toutes les formes de transition entre les virgules englobées et ces granulations basophiles[1]. Les quelques polynucléaires dégénérés que l'on trouve dans la préparation ne renferment pas de vibrions. *Pas de phénomène de Pfeiffer en dehors des cellules.*

Après 40 minutes, *surtout après* 60 minutes. — Le phénomène de la phagocytose est à son maximum. La plus grande partie des vibrions est englobée par les polynucléaires et transformée en granulations. Un certain nombre de ces granulations sont en voie de dissolution; leur coloration est plus pâle, légèrement métachromatique. *Pas de phénomène de Pfeiffer en dehors des cellules.*

Nous n'insisterons pas sur la phagocytose et sur la transformation granulaire intracellulaire, très manifestes dans cette expérience : ces faits ont été déjà maintes fois constatés et interprétés. Nous remarquerons tout simplement que les leucocytes

1. On pourrait objecter que ces granulations intra-leucocytaires ne sont que des granulations pseudo-éosinophiles plus ou moins modifiées. Il n'en est rien, vu que la Thionine phéniquée ne permet pas de mettre en évidence ces dernières formations granulaires.

polynucléaires réalisent cette transformation avec une extrême rapidité, tandis que le *liquide exsudatif*[1] ne modifie pas sensiblement les vibrions restés en dehors des cellules. Cette constatation n'est pas sans nous faire penser que le *protoplasma leucocytaire, à l'encontre de ce liquide exsudatif, réalise certaines conditions nécessaires à la genèse du phénomène de Pfeiffer.*

Portons plutôt notre attention sur ce qui se passe en dehors des cellules, et remarquons que le liquide exsudatif, *à l'encontre du sérum neuf*, n'est pas capable d'imprimer des modifications visibles aux vibrions cholériques. Il y a donc entre ce liquide, renfermant des leucocytes vivants, et le sérum neuf, tout en tenant compte bien entendu de la dilution, des différences manifestes au point de vue de l'activité bactériolytique. Or, si l'on se rappelle que le pouvoir microbicide de ce sérum est dû à l'intervention simultanée du complément et de la sensibilisatrice normale, on est conduit à *expliquer l'inactivité du liquide exsudatif soit par un manque de complément, soit par un manque de sensibilisatrice, soit par l'absence de ces deux principes à la fois.* C'est pour préciser laquelle de ces deux substances est insuffisamment renfermée dans le liquide exsudatif que nous avons entrepris les expériences suivantes.

Nous avons recherché tout d'abord *si ce liquide exsudatif renferme du complément.* A cette fin, nous nous sommes servi de vibrions préalablement mis en contact avec du sérum préventif, comme d'un réactif extrêmement sensible pour la mise en évidence de ce complément.

Expérience IX (19 juin). — On sensibilise des vibrions cholériques à l'aide d'un immun-sérum inactivé, de cobaye. Les vibrions ont été laissés en contact avec le sérum pendant quatre heures à la température de la chambre, isolés au moyen de la force centrifuge et lavés. Au microscope, ces vibrions sensibilisés apparaissent en grande partie agglutinés, mais n'offrent pas des changements morphologiques appréciables. On prépare des mélanges renfermant une partie d'exsudat péritonéal frais de cobaye, une partie d'eau physiologique et une partie d'une émulsion de vibrions sensibilisés.

Après 10 minutes de séjour au thermostat, on voit que les polynucléaires, pour la plupart agglutinés, renferment un nombre considérable de vibrions (beaucoup plus que dans l'expérience VIII). Un certain nombre de ces vibrions phagocytés sont déjà transformés en granulations de Pfeiffer. Les vibrions libres n'offrent pas des modifications appréciables ; ce n'est qu'avec peine

1. Ce terme désigne la partie liquide de l'exsudat péritonéal.

que l'on réussit à déceler çà et là quelques exemplaires en voie de transformation granulaire.

Après 20 minutes. — Presque la totalité des vibrions phagocytés sont déjà transformés en granulations. On découvre, en dehors des cellules, une intense modification granulaire des virgules; à côté d'individus entiers, mais faiblement colorés, on décèle de nombreuses granulations de Pfeiffer en voie de dissolution. *Phénomène de Pfeiffer extra cellulaire manifeste.*

Après 45 minutes. — La transformation granulaire des vibrions extracellulaires est complète. Les phagocytes ne renferment presque plus de vibrions entiers.

Cette expérience montre que le *liquide exsudatif renferme une certaine quantité de complément, capable de transformer en granules des vibrions préalablement sensibilisés au moyen d'un immun-sérum.* Cette constatation ne peut pourtant pas trancher d'une manière suffisamment démonstrative la question que nous nous sommes posée, à savoir si les différences observées entre le liquide exsudatif et le sérum frais, résident ou non dans l'absence de complément dans le premier de ces liquides. Cette expérience prouve tout simplement que la partie extracellulaire de l'exsudat péritonéal contient assez de complément pour transformer en granules des vibrions impressionnés par la sensibilisatrice de l'immun-sérum. Or, cette quantité de complément peut fort bien ne pas suffire, quand il s'agit de vibrions soumis à l'influence de la sensibilisatrice normale, dont l'activité est de beaucoup inférieure à celle de l'*immunkörper*.

Admettons *a priori* que la partie liquide de l'exsudat péritonéal et le sérum normal renferment la même masse de sensibilisatrice normale, mais que le premier de ces liquides est plus pauvre en complément que le second. Admettons aussi que les leucocytes polynucléaires, riches en complément, ne livrent ce principe qu'après leur destruction. Il résulte alors que tout moyen permettant d'agir d'une manière directe sur la vitalité des globules blancs renfermés dans l'exsudat péritonéal sera capable d'augmenter d'une manière sensible la teneur en complément du liquide exsudatif. Le pouvoir bactériolytique de ce liquide se rapprochera ainsi de celui du sérum frais. C'est ce que l'expérience suivante montre suffisamment.

Expérience X (6 mai). — On utilise l'exsudat aleuronique de cobaye normal. Des quantités variables de cet exsudat frais sont mélangées avec une émulsion de vibrions dans de l'eau physiologique, et maintenues pendant $2^{h}\ 40^{m}$ au thermostat.

	Culture.	Exsudat frais.	Eau physiologique.
Mélange 1.....	3	1	16
— 2.....	3	3	14
— 3.....	3	6	11
— 4.....	3	7	10

Voici ce que l'on observe :

Mélange 1. — Les rares leucocytes polynucléaires renfermés dans la préparation n'offrent pas d'altérations visibles. Les vibrions extracellulaires sont intacts.

Mélange 2. — Un grand nombre des globules blancs polynucléaires montrent des modifications régressives; leur protoplasma n'a plus le contour précis, nettement délimité, les cellules sont entourées d'une masse bleuâtre, légèrement granulée. Tandis que les vibrions situés loin des leucocytes ont conservé leur forme et leur colorabilité normales, ceux qui se trouvent au voisinage des polynucléaires en voie de destruction, et qui, pour la plupart, sont englobés par la masse bleuâtre péri-leucocytaire, ont subi une transformation granulaire très accusée.

Mélange 3 et 4. — Le phénomène décrit plus haut est sensiblement plus manifeste.

On voit, d'après cette expérience, que les polynucléaires en voie de destruction spontanée mettent en liberté *quelque chose* qui se trouve en plus forte concentration au voisinage de ces cellules et qui confère au liquide extracellulaire des propriétés bactériolytiques assez prononcées. Ce fait apparaît d'une manière plus frappante si, au lieu d'étudier ce qui se passe lors de la mort spontanée des leucocytes, on fait intervenir un agent leucolytique, agissant d'une façon spécifique sur les globules blancs, telle la *leucotoxine*.

Expérience XI (18 juin). — On prépare quatre mélanges *A*, *B*, *C*, et *D*, renfermant la même quantité de vibrions, d'exsudat péritonéal frais et d'eau physiologique. Ces mélanges sont maintenus pendant une heure à 38°. On examine alors le mélange *A*.

A. — *Pas de transformation granulaire extra cellulaire*. La plupart des polynucléaires ont englobé des vibrions ; ces vibrions sont en partie transformés en granulations de Pfeiffer.

On fait alors intervenir dans *B* la leucotoxine, en suivant le procédé résumé ci-dessous :

5 parties de *sérum leucotoxique inactivé*, provenant d'un lapin immunisé à l'aide de leucocytes de cobaye, sont mêlées à 5 parties de sérum frais de cobaye (complément) = *L*.

5 parties de *sérum inactivé de lapin normal* sont mêlées à un volume égal du même sérum frais de cobaye = *M*.

Après 1 heure de séjour au thermostat, *B* reçoit 2 gouttes du mélange leucotoxique *L ; C* reçoit 2 gouttes du mélange non leucotoxique *M; D* est conservé comme témoin. On remet le tout au thermostat et on examine après 30 minutes de séjour. Voici ce que l'on observe :

Le témoin ne diffère pas sensiblement du mélange *A*.

Le mélange C (non leucotoxique) montre que les *vibrions non phagocytés n'ont pas subi la transformation granulaire;* les polynucléaires contiennent un grand nombre de granulations de Pfeiffer.

Le mélange D (leucotoxique). — 1° Le liquide exsudatif renferme, à part quelques vibrions entiers, de nombreuses granulations. Ces granulations sont soit libres, et dans ce cas elles siègent plus ou moins loin des leucocytes, soit emprisonnées dans un magma albumineux, légèrement chagriné, bleuâtre, rappelant par son aspect le protoplasma leucocytaire et étant situé au voisinage des polynucléaires;

2° Ceux des leucocytes polynucléaires qui ont résisté à l'action dissolvante de la leucotoxine offrent un protoplasma bourré de granulations de Pfeiffer. Mais la plupart des globules blancs sont profondément altérés. On voit comment, par suite de la cytolyse, des débris de protoplasma abandonnent le noyau et se répandent dans le milieu ambiant. Ces débris renferment des vibrions transformés en granules, de sorte qu'il est aisé d'établir un rapport génétique intime entre les masses albumineuses décrites plus haut et ces débris protoplasmiques.

Un examen attentif de nos préparations permet d'interpréter comme il suit les phénomènes qui ont lieu dans l'expérience précédente : sous l'influence de la leucotoxine, la plupart des globules blancs polynucléaires se détruisent et laissent échapper leur contenu. Il faut se représenter ce contenu comme étant constitué par une partie liquide, les produits de sécrétion élaborés par le leucocyte vivant, et par une partie consistante, le protoplasma lui-même. Au moment où l'on a fait intervenir la leucotoxine, ce protoplasma renfermait déjà des vibrions transformés en granules, de sorte qu'une partie des granulations extracellulaires, à savoir celle qui existe à l'intérieur des débris protoplasmiques, a été incontestablement élaborée au sein des phagocytes. Il n'en est pas de même des granulations de Pfeiffer qui, n'ayant aucun rapport avec les éléments cellulaires, flottent à l'état de liberté dans le liquide exsudatif. Là, il faut accuser le contenu liquide du protoplasma leucocytaire. En effet, ce contenu, échappé après la mort des globules blancs et répandu dans ce liquide exsudatif, crée un milieu capable de transformer en granules une partie des vibrions non phagocytés.

Ces recherches montrent donc que les globules blancs polynucléaires peuvent, après leur destruction, conférer des propriétés bactériolytiques manifestes au liquide exsudatif provenant d'un cobaye normal. En quoi consiste cette action des globules blancs ? S'agit-il exclusivement d'une mise en liberté du complément, ou bien les leucocytes livrent-ils en même temps une sensibilisatrice normalement renfermée dans leur pro-

toplasma? Tout ce que nous savons sur les relations entre les leucocytes polynucléaires et les alexines nous porte plutôt vers la première de ces interprétations. Pour trancher cette question, il est pourtant nécessaire d'analyser de plus près les propriétés leucocytaires.

Expérience XII (21 juin). — *Les leucocytes polynucléaires du cobaye neuf renferment-ils la sensibilisatrice normale?*

6 c. c. d'un exsudat péritonéal riche en polynucléaires sont suspendus dans 5 c. c. d'eau physiologique, rapidement lavés et séparés par la force centrifuge. Le magma leucocytaire est repris par 1,5 d'eau physiologique et sert à la préparation d'un extrait, que l'on *inactive* à 56°.

On essaye l'action de cet extrait inactivé sur un exsudat péritonéal frais, riche en leucocytes. A cette fin, on dispose dans plusieurs chambres humides un mélange renfermant l'extrait leucocytaire, l'exsudat péritonéal et une émulsion de vibrions cholériques. On examine les préparations après 5′, 30′ et 70 minutes de séjour à 38°.

A aucun moment on ne peut saisir de différences appréciables entre les préparations qui renferment l'extrait leucocytaire inactivé, et le mélange témoin, où cet extrait a été remplacé par de l'eau physiologique. La phagocytose s'opère de deux côtés avec une intensité égale ; la transformation granulaire extracellulaire, à peine ébauchée, n'est pas plus accentuée dans la première série de préparations.

Il semble donc que les globules blancs polynucléés normaux ne renferment pas une substance résistante à la température de 56°, et capable d'influencer d'une manière appréciable l'activité bactériolytique du liquide exsudatif. On pourrait pourtant objecter que les résultats fournis par l'expérience précédente ne sont pas absolument démonstratifs. En effet, il est fort possible que la méthode suivie pour la préparation de l'extrait leucocytaire ne soit pas capable de mettre en évidence la sensibilisatrice normale, supposée renfermée dans les leucocytes polynucléés. Cette objection nous semble pourtant peu fondée. La méthode utilisée permet de déceler l'existence du complément à l'intérieur des leucocytes, elle n'est autre que le procédé recommandé par Buchner pour la préparation des substances bactéricides. Or, ce complément, comme ces substances, sont des principes beaucoup moins résistants que la sensibilisatrice.

Quoi qu'il en soit, il était indiqué de tenir compte de cette objection et de soumettre la méthode à une vérification expérimentale. Pour cela, nous avons recherché si l'extrait leucocytaire, obtenu en traitant suivant la méthode de Buchner des globules

blancs provenant *d'animaux immunisés activement*, renferme des quantités appréciables de sensibilisatrice. Que les leucocytes des organismes vaccinés, tant qu'ils siègent à l'intérieur des organes leucopoïétiques, soient, pendant un certain temps, les dépositaires de la sensibilisatrice cholérique et typhique, c'est ce que les expériences de Pfeiffer et Marx et les recherches de Wassermann et Deutsch le démontrent d'une manière évidente. Bordet[1], précisant le rapport intime qui existe entre la teneur du sang en globules blancs et la richesse du sérum en substance préventive prouve également que les *leucocytes circulants* jouent un rôle appréciable dans l'élaboration de cette sensibilisatrice. D'ailleurs, même si l'on se place au point de vue de la conception d'Ehrlich, on ne peut pas refuser à ces globules blancs une intervention active dans la production des substances immunisantes spécifiques. Ces globules, grâce aux récepteurs qu'ils renferment, peuvent, au même titre que d'autres éléments cellulaires, fixer les groupements haptophores microbiens, et réagir par la surproduction et la mise en liberté de ces récepteurs. Plus encore, d'après la théorie des « chaînes latérales », et si l'on considère comme suffisamment démontrés les faits avancés par Pfeiffer et Marx, on doit, au cours de l'immunisation anticholérique, saisir un moment où les globules blancs renferment une masse de sensibilisatrice plus forte que celle contenue dans un même volume de plasma : c'est le moment qui précède la mise en liberté des récepteurs.

Beaucoup de faits nous font donc présumer qu'à une époque déterminée de l'immunisation, les globules blancs peuvent renfermer du corps intermédiaire. Il s'agit de rechercher si, dans ce cas, la méthode de Buchner permet de mettre en évidence cette sensibilisatrice intra-leucocytaire.

Expérience XIII (29 juin). — *Les leucocytes polynucléaires de cobaye vacciné contre le vibrion cholérique renferment-ils de la sensibilisatrice?*

Le 21 juin, on introduit dans la cavité péritonéale de deux cobayes 1 culture 1/2 de vibrions cholériques (gélose), émulsionnée dans du bouillon et préalablement chauffée à 100°. Sept jours après, ces cobayes reçoivent dans le péritoine 5 c. c. de bouillon-aleurone. On retire 3 c. c. d'exsudat riche en polynucléaires, que l'on dilue dans 10 c. c. d'eau physiologique. Le magma leucocytaire, obtenu à l'aide de la force centrifuge, est rapidement

1. Bordet, *loc. cit.*

lavé et sert à la préparation d'un extrait, que l'on maintient pendant 1 heure, à 56° (*L*). Le sérum provenant de ces cobayes est également inactivé à cette température (*S*). Enfin, un troisième cobaye neuf fournit l'exsudat péritonéal frais. On dispose alors l'expérience de la manière suivante :

Mélange A renferme 1 p. exsudat frais + 1 p. L + 1 p. culture vibrionnienne.

Mélange B renferme 1 p. exsudat frais + 1 p. sérum inactif de cobaye vacciné, dilué de moitié + 1 p. culture.

Mélange C renferme 1 p, exsudat frais + 1 p. eau physiologique + 1 p. culture.

Après 10 minutes de séjour au thermostat, on observe dans le :

Mélange A (extrait leucocytaire). — La phagocytose est très apparente ; les vibrions englobés sont en partie transformés en granules. *Les virgules extracellulaires montrent pour la plupart le phénomène de Pfeiffer.*

Mélange B. — Phagocytose manifeste. *Presque tous les vibrions libres sont transformés en granules.*

Mélange C. — Phagocytose apparente, mais moins intense que dans les préparations A et B. *Les vibrions extracellulaires sont intacts*, on ne décèle pas plus de granules en dehors des cellules, qu'il n'y en a dans la culture elle-même.

Cette expérience montre que dans le cas où les leucocytes polynucléaires renferment réellement du corps intermédiaire, la méthode de Buchner est essentiellement propre à mettre en évidence ce corps. Il s'ensuit que si, lorsqu'on applique cette méthode à des leucocytes provenant d'animaux neufs, on ne réussit pas à déceler dans l'extrait leucocytaire la sensibilisatrice normale, *c'est que, effectivement, ces leucocytes ne renferment pas, ou ne contiennent que des quantités inappréciables de cette sensibilisatrice.*

Cette conclusion nous permet de saisir le mécanisme suivant lequel les leucocytes, atteints dans leur vitalité, exercent une influence favorisante sur l'activité bactériolytique du liquide exsudatif. Ces leucocytes, une fois détériorés spontanément ou sous l'influence de la leucotoxine, mettent en liberté un principe qui, réuni au liquide extracellulaire de l'exsudat, transforme en granules les vibrions non englobés par les phagocytes. Ce principe n'est pas une sensibilisatrice normale, vu que les globules blancs ne semblent pas renfermer cette substance. Au contraire, tout porte à croire que *ces globules blancs détruits, livrent au liquide extracellulaire le complément.*

Il devient alors aisé d'expliquer les différences que nous avons remarquées entre l'activité bactériolytique du sérum et

celle du liquide exsudatif. L'exsudat péritonéal n'est autre chose que du plasma transsudé, au sein duquel flottent d'innombrables leucocytes polynucléaires, pour la plupart vivants, ainsi que le témoignent leurs propriétés phagocytaires. Le sérum est du plasma moins la fibrine, mais du plasma ayant été en contact avec des globules blancs détruits pendant la coagulation. Si le sérum réalise le phénomène de Pfeiffer, tandis que le liquide extracellulaire de l'exsudat frais n'est pas capable de transformer les vibrions en granules, cela ne peut tenir qu'à l'état de vitalité plus ou moins grande des leucocytes. En effet, il suffit de détériorer les globules blancs contenus dans l'exsudat péritonéal, pour conférer au liquide exsudatif des propriétés se rapprochant de celles du sérum. Et, si nous nous rappelons que les leucocytes polynucléaires livrent, après leur mort, du complément et non pas de la sensibilisatrice, nous arrivons à la conclusion *que les différences observées entre le pouvoir bactériolytique du liquide exsudatif et celui de sérum frais trouvent leur raison d'être dans une inégale répartition du complément.*

Nous admettrons ainsi, avec Metchnikoff, Gengou, Bordet, etc., que dans le milieu hématique de l'animal vivant, milieu renfermant des globules blancs dont la vitalité ne laisse rien à désirer, les conditions doivent être très rapprochées de celles que nous avons constatées dans l'exsudat péritonéal frais. Le plasma des animaux neufs ne détermine pas la transformation granulaire des vibrions cholériques; c'est là un fait que l'expérience la plus simple vérifie entièrement. Il suffit en effet d'injecter dans la circulation générale d'un cobaye une faible quantité de vibrions (1/2 c. c. d'émulsion dans de l'eau physiologique, préalablement maintenue à la température du corps) et d'examiner ce qui se passe dans le sang après 3, 5, 10 minutes et 1 heure, pour constater qu'à aucun moment ces vibrions ne subissent la moindre trace de transformation granulaire. Or, une masse de sérum de beaucoup inférieure à celle renfermée dans le système circulatoire de l'animal, aurait suffi pour réaliser le phénomène de Pfeiffer.

Dans le liquide exsudatif, ainsi que dans le plasma sanguin des animaux neufs, et tant que les leucocytes sont vivants, il manque par conséquent un élément sans lequel, malgré la présence de la sensibilisatrice normale, la transformation granu-

laire extracellulaire n'est pas possible. *Les leucocytes renferment et retiennent fortement le complément au sein de leur protoplasma; ils ne livrent ce complément qu'après avoir subi des modifications involutives.*

Cette conclusion nous permet d'interpréter certains faits qui, au premier abord, semblent venir à l'encontre de l'opinion d'après laquelle le complément provient des leucocytes. M. Pfeiffer[1], dans son mémoire de 1896, refuse aux globules blancs la propriété d'engendrer la substance capable de réactiver l'immun-sérum, pour le motif que les exsudats riches en globules blancs sont loin d'être plus réactivants que les liquides péritonéaux pauvres en éléments cellulaires. On voit facilement le côté faible de cette objection. En effet, la richesse de ces exsudats en complément n'est pas *forcément* proportionnelle à la teneur de ces liquides en leucocytes, mais au nombre des globules blancs morts. Or, un exsudat riche en leucocytes peut ne renfermer qu'une faible quantité de cellules en état de souffrance.

Cette conclusion permet aussi de saisir pourquoi, dans l'expérience de Moxter, l'exsudat péritonéal contenant des globules blancs vivants n'était pas capable de réactiver un sérum neuf préalablement maintenu à 56°; pourquoi Gengou, chez quelques-uns de ses animaux, décèle un sérum manifestement bactériolytique, en même temps qu'un liquide exsudatif dénué de propriétés bactéricides.

*
* *

L'expérience IX nous a montré que le milieu extracellulaire de l'exsudat péritonéal frais renferme une certaine quantité de complément. Seulement, dans cette expérience, nous nous sommes servi de vibrions sensibilisés au moyen d'un immun-sérum et, on le sait, dans ces conditions, il suffit d'une très faible quantité de complément, pour la réalisation du phénomène de Pfeiffer. Or, personne ne contestera le fait que, parmi les leucocytes renfermés dans l'exsudat péritonéal frais, il y en a toujours un certain nombre qui sont déjà morts, ou qui succombent au cours de l'expérience, et qui peuvent par conséquent livrer au liquide ambiant cette quantité minime de complément.

1. R. Pfeiffer, *Ein neues Grundgesetz der Immunität*, Deut. Med. Woch., 1896.

Il y a lieu de nous demander si de telles conditions existent dans le cas où l'intervention des causes capables de diminuer la vitalité des leucocytes est réduite au minimum; en d'autres mots, dans un milieu renfermant des globules blancs intacts (le plasma), peut-on encore *déceler la présence de cette minime quantité de complément, capable de transformer en granules les vibrions sensibilisés ?*

Pour résoudre cette question, il est recommandable de s'adresser à l'organisme vivant et d'éviter autant que possible les dispositifs pouvant troubler d'une manière ou d'une autre la vitalité des leucocytes. On peut soit étudier *le sort des vibrions introduits dans la circulation générale des animaux immunisés activement*, soit rechercher ce qui se passe lorsqu'on *injecte dans le système sanguin des organismes normaux des virgules préalablement sensibilisées*. Mais, dans les deux cas, il est nécessaire de s'entourer de toutes les précautions possibles, afin d'éviter que l'introduction de l'émulsion microbienne ne soit ni assez brusque, ni assez abondante pour réaliser *in vivo* la plasmolyse des leucocytes. Il est évident que, dans ce dernier cas, les résultats fournis par l'expérience ne seront que trop peu démonstratifs : c'est ce que l'on objecte de bon droit aux recherches recentes de M. Rehns[1].

Peu de temps après la mémorable découverte de R. Pfeiffer, M. Metchnikoff et ses élèves ont montré que l'on peut empêcher la transformation granulaire qui a lieu lorsqu'on introduit dans le péritoine des cobayes neufs, des vibrions cholériques additionnés d'immun-sérum, si l'on a soin de préparer les animaux à l'aide d'une injection préalable de bouillon. Cette injection entrave la *phagolyse nécessaire* à la production du phénomène de Pfeiffer. Aujourd'hui, grâce aux recherches de M. Bordet, nous pouvons mieux saisir le sens de ces constatations. La phagolyse de M. Metchnikoff est synonyme à la mise en liberté du complément leucocytaire, en l'absence duquel la transformation granulaire des vibrions sensibilisés ne peut pas s'opérer. Le fait que cette transformation n'a pas lieu si l'on a soin d'empêcher la mort des globules blancs, est une forte présomption en faveur de l'absence du complément libre, tant dans le plasma

1. Rehns, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1901.

sanguin, que dans le milieu extracellulaire de l'exsudat péritonéal frais.

M. Rehns, dans la série d'expériences qu'il a récemment communiquées à la Société de Biologie, expériences destinées d'après l'auteur à trancher la question de la liberté du complément dans les humeurs, ne semble pas tenir compte de cette phagolyse. En effet, le procédé suivi par M. Rehns, quoique ressemblant dans ses grandes lignes à celui utilisé par M. Bordet et par nous-même (injection de globules rouges dans la circulation générale des animaux préparés, introduction d'érythrocytes sensibilisés dans le sang des animaux neufs), est défectueux, en ce sens qu'il réalise les meilleures conditions capables d'engendrer la phagolyse. Cet auteur injecte des quantités assez considérables de liquide dans un milieu comme le sang, dont les variations qualitatives retentissent facilement sur la vitalité des globules blancs, et soumet ainsi ces globules à l'influence directe des agents phagolysants. Aussi n'est-il pas surprenant que les érythrocytes injectés dans ces conditions soient rapidement dissous. Les conclusions posées par l'auteur (*liberté du complément dans le plasma*) apparaissent ainsi comme étant peu justifiées, et en tout cas non suffisamment soumises au contrôle de l'expérience. Il aurait été pourtant facile de voir l'état des leucocytes pendant l'hémolyse et de rechercher si la dissolution des érythrocytes est ou non accompagnée d'une disparition plus ou moins accentuée des globules blancs circulants.

C'est afin d'éviter cette cause d'erreur que nous nous sommes adressé non pas aux érythrocytes, mais aux vibrions cholériques. En effet, on peut, en se servant de cultures sur gélose suspendues dans de l'eau physiologique, introduire dans le sang un grand nombre de vibrions, sous un volume extrêmement réduit; on évite ainsi autant que possible la phagolyse, en même temps que l'on suit pas à pas les modifications que ces vibrions subissent dans le système circulatoire. Il suffit pour cela de faire des prises de sang à des intervalles plus ou moins espacés, et d'examiner les préparations obtenues en suivant la méthode d'Ehrlich (chaleur, coloration à la thionine phéniquée).

Avant d'entrer dans les détails de nos expériences, rappelons ici les résultats obtenus en 1895 par Bordet[1]. Cet auteur injecte

1. Bordet, *Loc. cit.*

des émulsions vibrioniennes dans la veine jugulaire de cobayes fortement vaccinés contre le vibrion de la Prusse orientale, et il examine le sang puisé à la patte ou à l'oreille 4, 5, 9 et 13 minutes après l'injection. Quoique dans une de ses expériences le chiffre des globules blancs tombe en une demi-heure de 16,500 à 8,000, Bordet ne voit qu'*une intense phagocytose débutant 5 minutes après l'introduction des vibrions, et pas trace de destruction extracellulaire.* Au contraire, les virgules phagocytées à l'état vivant, soit par les globules blancs circulants, soit par les leucocytes des organes (frottis), ne tardent pas à être transformées en granules, au sein même du protoplasma de ces leucocytes. Ces expériences de Bordet peuvent être considérées comme étant les plus démonstratives dans cet ordre d'idées.

Dans nos recherches, nous nous sommes servi de cobayes vaccinés contre le vibrion Cassino, et d'immun-sérums de cobaye et de cheval [1].

L'injection a été pratiquée dans la veine jugulaire, le sang puisé à l'oreille. Ajoutons enfin que, dans plus d'une expérience, afin d'éviter autant que possible la phagolyse, nous avons préparé les animaux à l'aide d'une injection préalable de bouillon ou d'eau physiologique.

Expérience XIV (14 mai). — *Comment se comportent les vibrions injectés dans la circulation générale des cobayes vaccinés activement?*

Un cobaye vacciné contre le choléra Cassino reçoit dans la veine jugulaire une culture vibrionienne sur gélose, émulsionnée dans 0,5 c. c. bouillon; le liquide d'injection a été préalablement maintenu pendant 30 minutes à 38°.

5 *minutes après l'injection :* le plasma sanguin contient soit des vibrions libres, filamenteux, d'aspect absolument normal; soit des masses bleuâtres, basophiles, emprisonnant de nombreuses virgules non modifiées. Ces masses albumineuses sont très vraisemblablement des plaquettes de Bizozzero. Dans aucune des préparations examinées, *on ne constate le moindre signe de transformation granulaire extracellulaire.* Au contraire, dans beaucoup de polynucléaires, on découvre des vibrions phagocytés. Ces vibrions, quelquefois en nombre de 3 à 6 dans une même cellule, sont entiers et ont été par conséquent englobés, sans qu'ils aient préalablement subi des modifications morphologiques. Les mastzellen et les éosinophiles ne renferment pas des vibrions.

15 *minutes après l'injection :* le nombre des polynucléaires est sensiblement diminué.

1. Le sérum de cheval a été obligeamment mis à notre disposition par M. Salimbeni, ce dont nous le remercions chaleureusement.

Malgré ce signe de leucopénie incipiente, on ne décèle pas de transformation granulaire extra-cellulaire. Au contraire, un grand nombre de vibrions englobés par les polynucléaires offrent le phénomène de Pfeiffer.

20′ *après l'injection* : Les polynucléaires sont extrêmement disparates dans le sang ; les lymphocytes persistent. Les vibrions non englobés sont entiers, mais rares.

30′ *après l'injection* : Le sang est envahi par des globules blancs polynucléaires dépourvus de vibrions et de granules. Le plasma ne renferme plus de virgules ; il est également dépourvu de granulations de Pfeiffer.

Cette expérience nous montre que, conformément aux résultats obtenus par Bordet, les vibrions cholériques introduits dans la circulation générale des cobayes vaccinés, ne subissent dans le plasma aucun changement morphologique appréciable. Une partie des virgules injectées est rapidement (en moins de 5 minutes dans certaines de nos expériences) englobée par les polynucléaires, et offre, au sein du protoplasma leucocytaire, le phénomène de Pfeiffer. On peut suivre toutes les formes de transition imaginables entre les vibrions entiers et les granulations rondes, basophiles, qui parfois remplissent ce protoplasma. Une autre partie, non phagocytée, circule à l'état de liberté dans le plasma, et ne tarde pas à s'accoler aux plaquettes de Bizozzero. Mais jamais nous n'avons saisi la moindre modification de ces vibrions libres, tant au point de vue de leur colorabilité, qu'à celle de leur forme. Or, le sérum frais des animaux qui ont servi à ces expériences était doué d'une forte activité bactériolytique ; plus encore, ce sérum, préalablement maintenu pendant une heure à 56°, pouvait être réactivé à l'aide d'une quantité sensiblement faible de complément. Nous sommes par conséquent autorisés à conclure que *le plasma circulant de ces animaux activement immunisés, quoique riche en immunkörper, est incapable de réaliser in vivo le phénomène de Pfeiffer, pour le motif que ce plasma est dépourvu de complément libre. Les leucocytes, tant qu'ils conservent leur vitalité, ne laissent donc pas s'échapper le complément qu'ils renferment.*

La phagocytose s'opère chez ces animaux avec une étonnante rapidité. Il n'en est pourtant pas toujours ainsi : du moins les préparations de sang puisé à l'oreille ne montrent-elles pas dans tous les cas ce fort englobement des vibrions que nous avons décrit plus haut. Chez certains animaux, surtout chez ceux qui n'ont subi aucune préparation, l'introduction des virgules cholériques est instantanément suivie d'une disparition plus ou moins

complète des polynucléaires circulants. Dans ces cas, le sang ne contient que des lymphocytes et quelques gros mononucléaires. Le plasma renferme une quantité variable de vibrions libres ou accolés aux plaquettes de Bizozzero ; *ces vibrions n'offrent pas d'altération visible*. Mais, si l'on a soin d'examiner les frottis de poumon ou de rate, on s'aperçoit que cette disparition des polynucléaires circulants est due à l'accumulation de ces leucocytes dans les organes, et que la plupart des globules blancs réfugiés renferment soit des vibrions entiers, soit des granulations de Pfeiffer et des formes de passage.

Cette brusque disparition des polynucléaires circulants, polynucléaires dont un certain nombre ont déjà englobé des vibrions lors de leur séjour dans le torrent circulatoire, doit être considérée comme témoignant d'un commencement de phagolyse. En effet, là où l'on réussit encore à saisir sur place ces phagocytes, on peut parfois constater comment certains polynucléaires s'accolent les uns aux autres, pour former des colonies leucocytaires absolument identiques à celles observées par Metchnikoff et Cantacuzène dans l'exsudat péritonéal en voie de phagolyse. Plus encore, si l'on examine les coupes du poumon de ces cobayes vaccinés, à un moment où le *sang renferme des vibrions libres, non transformés en granules*, voici ce que l'on observe :

Les capillaires pulmonaires sont bourrés de polynucléaires dont le protoplasma contient des vibrions en voie de transformation granulaire. Ces leucocytes constituent des thrombus qui bouchent par place toute la lumière des vaisseaux. Çà et là on décèle des amas vibrioniens assez volumineux, *montrant tous les signes caractéristiques du phénomène de Pfeiffer*. On voit comment les vibrions entiers subissent la transformation granulaire *en dehors des cellules*, mais, ce que l'on ne manque pas de constater, c'est que *ces amas sont constamment entourés par des polynucléaires en voie de phagolyse*. L'examen minutieux des préparations permet de voir qu'au voisinage de ces amas, le protoplasma des phagocytes se désagrège, le noyau de ces cellules devient hyperchromatique et apparaît comme étant dépourvu de corps cellulaire.

En résumé, lorsque, par suite d'une disparition des leucocytes circulants, on ne réussit pas à déceler dans le sang des phénomènes de phagocytose, il s'agit en réalité, comme l'ont

déjà vu Bordet et Werigo, d'une accumulation des globules blancs polynucléaires dans certains organes. Parmi ces leucocytes réfugiés, le plus grand nombre ont déjà englobé des vibrions lors de leur séjour dans les vaisseaux périphériques, et continuent à modifier ces vibrions au sein des organes où ces leucocytes s'abritent. Une autre partie des globules blancs disparus emprisonnent les amas de vibrions libres, et sans mettre en jeu leurs propriétés phagocytaires, transforment ces vibrions en granulations de Pfeiffer. Cette transformation granulaire extracellulaire ne s'opère pas sans que l'on puisse déceler un rapport intime entre les leucocytes et les amas vibrioniens. Il s'agit donc là de la mise en liberté du complément leucocytaire, complément dont la présence est nécessaire à la dissolution des vibrions flottant dans un *plasma riche en sensibilisatrice, mais dépourvu de principe bactériolytique libre.*

Il serait erroné de penser que la leucopénie qui, dans certains cas, suit de près ces injections vasculaires, est entièrement due à une destruction de polynucléaires, s'opérant dans le système vasculaire périphérique. Nous sommes plutôt disposés à considérer cette disparition des polynucléaires circulants, comme témoignant en faveur d'un phénomène de chimiotaxie négative, et en cela, nous sommes d'accord avec Ehrlich, Goldscheider et Jakob, etc. Les phagocytes, sous l'influence chimiotactique des principes microbiens injectés, se réfugient dans les organes: c'est suatout là qu'à notre avis s'opère la dissolution *d'un certain nombre* de globules blancs et la mise en liberté du complément. Nous ne nions pas que même dans cette circulation périphérique, des leucocytes polynucléaires, trop énergiquement touchés par les liquides injectés, puissent subir des modifications lytiques. L'existence de ces amas de globules blancs, en voie de destruction, témoigne plutôt en faveur de cette manière de voir. Seulement, l'examen attentif de nos préparations nous autorise à supposer que certains tissus, plus particulièrement le poumon, offrent des conditions éminemment favorables à la réalisation de cette phagolyse. S'agit-il là d'une action directe de l'endothélium des vaisseaux pulmonaires, ou d'une autre cause purement mécanique, nous n'en savons rien. Tout ce que nous pouvons dire pour l'instant, c'est que si l'on réussit à retenir dans une zone vasculaire périphérique ces leu-

cocytes circulants ayant déjà subi l'influence des liquides injectés, on arrive à empêcher dans une certaine mesure la phagolyse ; on ne constate alors que la destruction *intracellulaire* des vibrions.

Expérience XV (28 juin). Un lapin vacciné contre le vibrion Cassino, possédant un sérum fortement bactériolytique, est préparé à l'aide d'une injection intra-vasculaire de 5 c. c. de bouillon. 3 heures après cette injection on constate une forte leucocytose polynucléaire. A ce moment on introduit, dans la circulation de l'animal, 0,5 c. c. d'une émulsion épaisse de vibrions cholériques et, immédiatement après l'injection, on lie à l'aide d'une bande élastique l'oreille gauche, dont on a préalablement dilaté les vaisseaux. On examine comparativement le sang puisé dans la veine marginale des deux oreilles.

OREILLE LIGATURÉE	OREILLE NON LIGATURÉE
5 minutes après l'injection.	
1re PRISE Un grand nombre de polynucléaires ont englobé des vibrions entiers. *Les microbes non phagocytés*, pour la plupart accolés aux plaquettes de Bizozzero, *n'offrent pas la transformation granulaire.*	1re PRISE Leucopénie polynucléaire manifeste. Quelques phagocytes renferment des vibrions entiers. *Les virgules non phagocytées n'ont pas subi la transformation granulaire.*
2e PRISE Les phagocytes renferment des vibrions en voie de transformation granulaire. Les virgules libres n'ont subi aucune modification.	2e PRISE La leucopénie est très accentuée. Le sang renferme des lymphocytes et de très rares polynucléaires dépourvus de vibrions. Les microbes ont disparu du plasma, sans que l'on ait constaté des signes de transformation granulaire extracellulaire.
20 minutes après l'injection.	
Les granulations intraleucocytaires ont été pour la plupart digérées. Les vibrions extracellulaires sont devenus extrêmement rares. *Pas de phénomène de Pfeiffer en dehors des leucocytes.*	Leucopénie polynucléaire totale. Les vibrions ont disparu du sang.

Ces recherches montrent donc qu'il n'est pas aussi facile d'empêcher totalement la destruction des globules blancs et que, même dans le cas où l'on s'entoure de précautions, un certain nombre de leucocytes, surtout ceux qui se sont réfugiés dans les organes, subissent tôt ou tard une destruction pouvant mettre

du complément en liberté. S'il en est ainsi, la marche des phénomènes qui ont lieu dans le plasma circulant dépend de l'intensité suivant laquelle s'opère la phagolyse au sein des organes. On peut prévoir deux possibilités :

1° La quantité de complément mise en liberté par les phagocytes ayant succombé à l'intérieur de ces organes *est trop petite* pour que, une fois passée dans la circulation générale et dissoute dans le plasma sanguin, elle suffise à réactiver la sensibilisatrice renfermée dans ce plasma. Dans ce cas, les vibrions accumulés dans les organes, surtout ceux qui siègent au voisinage des leucocytes en voie de phagolyse, subiront la transformation granulaire, tandis que les microbes circulant dans les vaisseaux périphériques resteront intacts. Cette circonstance a été réalisée dans une de nos expériences, où les vibrions puisés dans le sang étaient entiers, tandis que le poumon renfermait des granulations de Pfeiffer;

2° La quantité de complément ayant passé dans le plasma à la suite de la phagolyse intra-organique suffit pour réactiver la sensibilisatrice circulante. Les vibrions subiront alors la transformation granulaire à l'intérieur des vaisseaux périphériques. C'est ce qui résulte clairement de l'*expérience* XVI (30 juin). Un lapin fortement vacciné reçoit dans la circulation générale 1 c. c. d'une émulsion épaisse de vibrions cholériques. On lie, à la fin de l'expérience, l'oreille droite et on étudie la marche de la destruction des vibrions dans le territoire vasculaire ainsi isolé. *Au moment où les globules blancs polynucléaires ont presque disparu de la circulation générale*, on introduit dans la veine marginale de l'oreille gauche une nouvelle quantité de vibrions, et on lie rapidement cette oreille. On examine comparativement le sang puisé dans les deux oreilles. Le résultat est très démonstratif. Tandis que dans l'oreille droite la destruction des vibrions s'opère exclusivement à l'intérieur des phagocytes, *dans l'oreille gauche, là où le plasma, isolé pendant la phagolyse, est censé contenir du complément libre, la transformation granulaire extracellulaire est extrêmement prononcée.*

Toutes ces considérations nous portent vers les conclusions suivantes :

1° Les vibrions cholériques injectés dans la circulation générale des animaux vaccinés, de manière à éviter autant que possible la pha-

golyse, ne sont jamais transformés en granules au sein du plasma circulant. Le phénomène de Pfeiffer n'a lieu que dans les organes, et alors il s'opère à l'aide du complément mis en liberté par les phagocytes accumulés à l'intérieur de ces organes;

2° Le plasma des animaux immunisés ne renferme pas de complément libre;

3° La phagocytose s'opère chez ces animaux avant toute intervention visible des humeurs.

*
* *

Les expériences qui consistent à *introduire, dans la circulation générale des animaux neufs, des vibrions préalablement sensibilisés au moyen d'un immun-sérum, nous conduisent aux mêmes conclusions.*

Expérience XVII (22 mai). — On met en contact pendant 6 heures des vibrions cholériques avec un immun-sérum inactivé, de cobaye. Le magma vibrionien est isolé à l'aide de la force centrifuge, lavé et suspendu dans 0,6 d'eau physiologique.

Les microbes examinés au microscope n'offrent pas des modifications morphologiques appréciables; ils sont pour la plupart agglutinés.

Un cobaye normal, préalablement préparé à l'aide d'une injection intravasculaire de bouillon, reçoit dans la jugulaire 0,6 de cette émulsion de vibrions sensibilisés.

5 *minutes après l'injection.* — Le plasma renferme des vibrions soit libres, soit accolés aux plaquettes de Bizozzero. *Ces vibrions n'ont pas subi la transformation granulaire.* Les polynucléaires contiennent des vibrions entiers, ou en voie de granulisation.

15 *minutes après l'injection.* — Diminution sensible des vibrions et des polynucléaires. *Pas de phénomène de Pfeiffer extracellulaire.*

L'animal est sacrifié 18 *minutes* après l'injection des vibrions.

Les *coupes du poumon* montrent, à part d'innombrables polynucléaires renfermant des vibrions pour la plupart transformés en granules, des amas de vibrions entourés de *leucocytes en voie de phagolyse.* Ces vibrions présentent le phénomène de Pfeiffer extracellulaire.

Cette expérience, plusieurs fois répétée, montre que, même dans le cas où l'on se sert d'animaux normaux et de microbes sensibilisés, le résultat est identique à celui qu'on obtient quand on s'adresse aux organismes activement immunisés. Des deux côtés, et à la condition que la phagolyse ne soit pas trop accentuée, les vibrions ne subissent pas la transformation granulaire au sein du plasma circulant; des deux côtés, la phagocytose s'opère avec une étonnante rapidité. Par conséquent, *le plasma des*

animaux neufs, comme celui provenant des organismes activement vaccinés, ne renferme pas du complément libre.

C'est pour saisir de plus près encore l'état du complément dans le plasma circulant, que nous avons entrepris de nouvelles recherches, ayant pour but de préciser la teneur en complément des liquides exsudatifs provenant des animaux, auxquels on injecte préalablement du sérum complémentaire. L'*humeur aqueuse* des lapins neufs n'est pas capable de réactiver la sensibilisatrice anticholérique; ce liquide, dépourvu de leucocytes, ne renferme pas de complément. Plus encore, l'*humeur aqueuse de nouvelle formation* que l'on obtient quand, après avoir ponctionné la chambre antérieure de l'œil, on referme la plaie de la cornée, est tout aussi dépourvue de complément que l'humeur aqueuse provenant d'animaux neufs. La première idée qui vient à l'esprit, c'est que cette humeur, comme en général tous les liquides exsudatifs dépourvus de cellules blanches (œdèmes passifs), ne contient pas de complément, pour le motif que le plasma sanguin n'en contient pas non plus.

Pourtant, et c'est là une objection que l'on trouve dans le travail de M. Rehns, on ne peut pas savoir si, lors de l'exsudation, certaines conditions vitales ou mécaniques ne s'opposent pas à la filtration du complément *préexistant* dans le plasma, si l'endothélium vasculaire par exemple, dont l'intervention active dans l'élaboration des humeurs (lymphe) a été mise en évidence par Heidenhain, ne choisit pas parmi les principes dont il est sollicité.

Pour trancher la question, nous nous sommes adressé à l'expérimentation. Nous avons recherché *la teneur en complément de l'humeur aqueuse de nouvelle formation, chez des animaux auxquels nous avons préalablement injecté, dans le sang, une quantité relativement grande de sérum complémentaire.* Ce sérum était fourni par l'animal qui servait à l'expérience.

Expérience XVIII. — Un gros lapin neuf (A) est saigné le 5 juillet; le sang retiré donne 18 c. c. de sérum, que l'on débarrasse de globules à l'aide de la force centrifuge. Le 6 juillet, on retire l'humeur aqueuse de cet animal, ainsi que celle d'un lapin témoin (*B*), et l'on introduit dans la circulation générale du lapin A les 18 c. c. de *son propre sérum.*

40 minutes après l'injection, les 2 lapins sont de nouveau légèrement

saignés; le sang obtenu, traité d'après la méthode de Gengou (tubes paraffinés) sert à la préparation du plasma.

60 min. après l'injection on retire *l'humeur aqueuse nouvellement formée.*
Soit *P*, le plasma du lapin *A*.
P', — — *B*.
H, l'humeur aqueuse nouvellement formée du lapin *A*.
H', — — — *B*.

On apprécie la teneur en complément de ces liquides, du sérum provenant de l'animal A, ainsi que celle de l'humeur aqueuse retirée avant l'injection. A cette fin, une culture vibrionienne est préalablement mise en contact avec un sérum préventif inactivé (cheval); on dispose l'expérience comme il suit :

1)	*Plasma témoin* P', à 1/10, 2 parties,	cult. sensibilisée,	2 p.,	eau physiol.,	2 p.
2)	— P', non dilué, 2 p.,	—	2 p.,	—	2 p.
3)	*Plasma du lapin A*, P, à 1/20, 2 p.,	—	2 p.,	—	2 p.
4)	— — P, à 1/10, 2 p.,	—	2 p.,	—	2 p.
5)	— — P, non dilué, 2 p.,	—	2 p.,	—	2 p.
6)	*Humeur aqueuse témoin*, H', 3 p.,	—	2 p.,	—	4 p.
7)	— — *du lapin A*, H, 3 p.,	—	2 p.,	—	4 p.
8)	*Sérum du lapin*, A, à 1/20, 2 p.,	—	2 p.,	—	5 p.
9)	— non dilué, 2 p.,	—	2 p.,	—	5 p.

Résultat après 30 minutes de séjour au thermostat.

1) Rien.
2) La plupart des vibrions sont transformés en granules; on constate pourtant des microbes entiers.
3) Rien.
4) Commencement de transformation granulaire.
5) Complet.
6) *Trace de transformation granulaire. La grande majorité des vibrions sont bien conservés.*
7) *La transformation granulaire est complète.*
8) Rien.
9) Complet.

L'humeur aqueuse du lapin A, retirée 20 heures après l'injection de sérum, ne possède plus la propriété de réactiver la sensibilisatrice anticholérique.

Dans une autre expérience, l'humeur aqueuse ne renfermait pas de complément; seulement, dans ce cas, nous avons examiné, trop tard après l'introduction du sérum, le contenu de la chambre antérieure de l'œil, et il est très probable qu'avec le temps, les tissus fixent le complément, comme il semble résulter des recherches de V. Dungern (V. plus loin).

Ces expériences montrent donc *que les liquides transsudatifs ne renferment pas de complément, pour le motif que ce complément n'existe pas à l'état de liberté dans le plasma. En effet, si, artificiellement, on enrichit ce plasma en matière bactéricide, ces liquides transsudatifs deviennent capables de réactiver la sensibilisatrice.*

*
* *

Les résultats fournis par ces expériences où, pour déceler le complément, nous nous sommes servi des réactifs les plus sensibles, tels les vibrions préalablement mis en contact avec l'immun-sérum, concordent pleinement avec ceux que nous avons obtenus lors de nos recherches sur les exsudats normaux. Tout porte vers la conclusion que le leucocyte polynucléaire, dépositaire par excellence du complément, retient fortement cette substance au sein de son protoplasma et ne la livre au plasma qu'après avoir plus ou moins souffert dans sa vitalité.

Le principe de l'absence du complément libre dans le plasma n'est pas en désaccord avec les notions que l'on possède à l'heure qu'il est sur l'immunité anticellulaire et antimicrobienne. Sans insister sur les constatations de Bordet[1], de Nolf[2], de Müller[3], qui laissent entrevoir l'existence de relations intimes entre le complément et les leucocytes; sans nous arrêter sur la découverte de Wassermann[4], à savoir la possibilité d'engendrer de l'anticomplément en injectant des leucocytes, nous désirons parler ici des faits récemment établis par Ehrlich et Morgenroth[5] et par von Dungern[6]. La notion de la *pluralité des compléments*, due aux premiers de ces auteurs, peut être facilement mise d'accord avec le principe de la non-liberté et de l'origine leucocytaire de ces compléments. En effet, il ne nous paraît pas invraisemblable que le leucocyte puisse fabriquer et renfermer plusieurs compléments. Ne connaît-on pas des cellules qui élaborent à la fois du glycogène, des composés biliaires et de la graisse? N'avons-nous pas décrit récemment (*Journ. de Path. générale*, 1901) des globules blancs renfermant, en même temps que des granulations basophiles, des formations granulaires différant de celles-ci par leur réactions colorantes et par leurs propriétés histochimiques? — De même que, d'après Metchnikoff, Salimbeni et Gengou, certaines catégories de globules blancs, tels les gros mononucléaires, ne paraissent pas renfermer de l'alexine hémolytique, de même également il est possible

1. Bordet, *loc. cit.*
2. Nolf, ces *Annales*, 1900.
3. Muller, *Cbl. für Bakt.*, 1901.
4. Wassermann, *Zft. für Hyg*, 1901, Bd. XXIX.
5. Ehrlich et Morgenroth, Ueber Hæmolysine, *Berl. kl. Woch.*, 1900-1901.
6. V. Dungern, Beitr. zur Immunitätslehre, *Münch. med. Woch.*, 1900.

qu'une espèce leucocytaire, les polynucléaires, élabore plusieurs compléments. La notion de la pluralité des compléments n'a donc rien qui puisse venir à l'encontre de la manière de voir que nous partageons.

Également conforme à notre thèse est le fait que l'injection d'anticomplément à un animal neuf détermine une diminution sensible de la teneur du sérum en complément. On sait en effet, d'après l'expérience précitée de Wassermann, que l'administration de leucocytes, préalablement lavés, est capable d'inciter une production d'anticomplément. Il est à supposer, si l'on se place au point de vue de la théorie des *chaînes latérales*, que les leucocytes normaux renferment des récepteurs pouvant fixer ces anticompléments, et que ces récepteurs leucocytaires ne sont autre chose que le complément contenu dans le protoplasma des globules blancs. S'il en est ainsi, on conçoit comment l'anticomplément, introduit dans l'organisme vivant, sature le groupe haptophore du complément intraleucocytaire, et *diminue ainsi la quantité de complément « actif »* que ces leucocytes peuvent mettre en liberté après la coagulation du sang.

Mais ce qui, parmi les faits connus, plaide le plus en faveur de la non-liberté du complément dans le plasma circulant, ce sont les expériences de v. Dungern[1]. Cet auteur recherche le pouvoir fixateur que les organes (foie, rein, rate, etc.) provenant de plusieurs mammifères et oiseaux normaux, exercent vis-à-vis du complément renfermé dans le sérum de lapin. Il constate qu'en effet, certains de ces organes peuvent débarrasser le sérum de son complément, et que le principe fixateur est une substance se détruisant à 98° (expériences avec le charbon). Il voit de plus que « *auch die Körperzellen des gleichen Thieres dieselbe Erscheinung bedingen* ». On saisit facilement le côté contradictoire de ces recherches, si l'on a soin de rapprocher les données fournies par V. Dungern, de la conception d'après laquelle le complément se trouve à l'état de liberté dans le plasma circulant. En effet, puisque les organes du lapin, employés aussi frais que possible, peuvent, *in vitro*,

1. Nous avons vérifié récemment ces constatations de V. Dungern. D'après nos recherches, il résulte que non seulement des tissus, mais aussi des cellules libres, tels les spermatozoïdes du taureau, fixent le complément hémolytique renfermé dans le sérum du lapin neuf.

débarrasser le sérum de cet animal du complément qu'il renferme, c'est que, *pendant la vie*, ces organes n'ont pas été *saturés* de complément, en d'autres mots que les affinités complémentophiles des récepteurs renfermés dans ces organes n'ont pas été totalement occupées. Or, le sérum de ces animaux neufs contient des quantités appréciables de complément. Il résulte donc, d'après les recherches de V. Dungern, et si l'on admet que le complément est à l'état de liberté dans le plasma, *que des éléments non saturés peuvent persister, dans cet état, dans un milieu saturant.* C'est là, à notre avis, une impossibilité, et les faits ne peuvent être mis d'accord qu'à la condition d'admettre que, pendant la vie, *le complément n'existe pas à l'état de liberté dans le plasma et que les organes ne se saturent pas de complément, pour le motif qu'ils n'en ont pas à leur disposition.*

A la fin de ce travail, nous prions M. Metchnikoff de bien vouloir recevoir l'expression de notre vive reconnaissance, pour la bonne volonté avec laquelle il nous a conduit dans nos recherches.

ERRATUM. — Dans le mémoire de MM. Tchistowitsch et Yourevitsch, p. 757, ligne 7, lire « sur 56 champs au moins», au lieu de « sur 5-6 champs au moins ».

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'IMMUNITÉ DES ANIMAUX
VIS-A-VIS DU BACILLE DU CHANCRE MOU

PAR LE Dr J. HIMMEL, DE KAZAN

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les tentatives pour découvrir la cause du chancre mou ont commencé en 1837 avec Donné [1], qui l'avait attribué à un vibrion banal, le *vibrio lineola*. Straus [2] avouait, en 1875, avoir échoué dans cette recherche. Primo-Ferrari [3], Mannino [4], de Lucca [5], ont ensuite décrit, comme agents de contage, deux bacilles et un microcoque qui ont perdu crédit depuis le travail de Ducrey [6] en 1889. En faisant sur des malades des inoculations successives d'ulcérations chancrelleuses, ce médecin trouva que les dernières aboutissaient à un type unique de bâtonnets à bouts arrondis, ayant 1,5 μ de longueur et 0,5 μ d'épaisseur.

L'inoculation à l'homme du pus chancrelleux, ne contenant que ces microbes, provoquait des ulcérations chancrelleuses typiques.

Les résultats furent toujours positifs dans l'inoculation du pus chancrelleux, sauf dans un seul cas où le malade fébricitait (température 40,2°), et ce fait est d'accord avec les expériences d'Aubert [7], d'après lequel une température au-dessus de celle de l'organisme humain rend inoffensif le virus du chancre mou.

1. Cours de microscòpie, 1844, p. 201, Paris.
2. *Ann. de dermatologie et de syphiligraphie*, 1885, n° 1, p. 5.
3. *Id.*, 1886, p. 159.
4. *Id.*, 1885, p. 486.
5. *Gazzetta d. ospitali*, 1886, nos 38 à 41, et *Giorn. italiano d. mal. vener. e della pelle*, 1886, p. 238.
6. Congrès internat. de dermatol. et de syphiligraphie, Paris, 1889, et *Monatschr. f. prakt. Dermatol.*, 1889, IX.
7. *Lyon medic.*, 1882, n° 32, p. 479.

Dans un cas où le chancre avait un caractère phagédénique, Ducrey a obtenu une ulcération phagédénique en inoculant à la main d'un malade du pus d'une pustule déjà obtenue par inoculation, pus qui ne contenait pas d'autres microorganismes. Ce fait démontre que les caractères de l'ulcération dépendaient surtout du terrain où les inoculations étaient faites.

Ducrey n'a pu constater la présence des bactéries sur les coupes des ulcérations du chancre mou, et n'a pas réussi à les cultiver sur les milieux de culture artificiels.

Après le travail de Ducrey parut bientôt celui de Krefting [1], qui fit aussi 7 à 8 inoculations successives de pus de chancre mou à l'homme, et qui trouva chez tous ses malades (23) le seul et même bâtonnet court.

Ces deux derniers savants décrivent d'une façon absolument identique le bacille du chancre mou qu'ils ont découvert. Ils le disent court, épais, arrondi aux extrémités, étranglé vers le milieu, rappelant le 8 de chiffre ou les haltères. Ces bacilles sont tantôt isolés, tantôt réunis par groupes, se trouvent tantôt en dehors des globules de pus, tantôt à leur intérieur, où ils sont en si grand nombre que Krefting considérait le globule de pus comme le lieu de prédilection de ce microorganisme. On ne peut pas dire, dit Krefting, que tous ces bacilles aient la même longueur, même lorsqu'ils se trouvent dans une seule et même colonie, provenant d'une seule ulcération chancrelleuse.

Cet auteur les a trouvés dans toutes les pustules du chancre mou; leur nombre était d'autant plus considérable que le développement de la pustule était plus rapide, de sorte qu'il y avait corrélation parfaite entre l'intensité du processus inflammatoire et le nombre des bactéries dans le pus.

A la même année fut publié le travail d'Unna, de Hambourg [2], qui, dans les chancres mous excisés, trouvait toute la zone externe farcie de petits bâtonnets courts pénétrant dans la profondeur des tissus, et disposés en chaînettes composées de 4 à 10 éléments. On ne les voit jamais ni dans les leucocytes ni dans les vaisseaux sanguins, mais toujours dans les fentes lymphatiques, entre les cellules des tissus.

Unna n'a pas parlé bien catégoriquement d'une différence

1. *Arch. f. Dermat. u. Syphilis, Ergänzungshefte*, II, 1892, p. 41.
2. *Monatsh. f. prakt. Dermatol.*, 1892, vol. 14, p. 413

entre son streptobacille et le bacille de Ducrey-Krefting.

W. Petersen [1], qui travailla dans la même direction qu'Unna, affirma plus nettement la spécificité du streptobacille en question. Mais déjà, en 1894, Colombini [2], qui avait coloré le bacille du chancre mou avec des matières colorantes très variées, et qui avait examiné, à ce point de vue, un très grand nombre d'ulcères chancrelleux et de bubons, se prononça très catégoriquement en faveur de l'identité des deux microorganismes en question.

Les recherches ultérieures n'apportèrent presque aucun fait nouveau sur ce point : elles confirmèrent les résultats déjà obtenus, apportèrent quelques modifications dans la technique de la coloration, et permirent de constater à nouveau que le chancre mou n'est pas inoculable aux animaux, à l'exception du singe, chez lequel d'ailleurs on ne réussit pas non plus toujours à obtenir un chancre typique.

Tels furent les travaux de Quinquaud et M. Nicolle [3], de Nicolle et de Venot [4], de Ch. Nicolle [5], de Rivière [6], de Jullien [7], de Ch. Audry [8] et de Cheynin [9].

Plus tard commencent des recherches sur l'ensemencement des bacilles du chancre mou.

M. Petersen [10] avait déjà noté, dans son travail, qu'il avait réussi à cultiver les bacilles du chancre simple sur la gélose-sérum (2 : 1). Plus d'un an se passa depuis la publication de ce travail sans qu'aucun fait nouveau concernant la question de la culture des bacilles chancrelleux fût acquis. Ce n'est qu'en 1897 qu'Istamanov et Akopiantz [11] communiquèrent à la Société médicale de Tiflis qu'ils avaient réussi à obtenir une culture pure du bacille de Ducrey sur la gélose additionnée d'un fragment de peau humaine macérée ; l'inoculation à l'homme des bacilles provenant de ces cultures provoquait des chancres mous typiques.

1. *Centralbl. f. Bacter. u. Parasitenkunde*, 1893, XIII.
2. *Gaz. degli. ospitali* (anal. in *Wratch*, 1896, n° 33).
3. *Soc. de dermat. et de syphil.*, 7 juillet 1892.
4. *Med. moderne*, 1893, n 58.
5. *Th. de Paris*, 1893.
6. *Journal des conn. méd.*, 4 mai 1893.
7. *Annales de dermat.*, 1892, p. 473.
8. *Gaz. hebdomad. de méd. et de chir.*, 1893 (anal. in *Wratch*, 1893).
9. *Wratch*, 1893, n° 48; *Ann. de dermat. et de syph.*, 1894, n° 3.
10. *Wratch*, 1895, n° 5.
11. *Comp. rendus de la Soc. médic. de Tiflis*, 1897.

Lenglet [1] obtenait également des résultats positifs, lorsqu'il recourait au même milieu, mais il échouait avec les milieux ordinaires. L'inoculation des cultures à l'homme donnait des résultats positifs, tandis que la même inoculation, faite à des animaux, sous la peau ou dans le péritoine, restait négative.

Au XIIIe Congrès international de médecine, MM. Bezançon, Griffon et Lesourd [2] firent une communication où ils disaient avoir pu cultiver le bacille du chancre simple sur sang gélosé. La culture fut obtenue dans toutes les expériences, aussi bien lorsque l'on ensemençait du pus du chancre primitif que celui du chancre déjà inoculé ou du bubon. Inversement l'inoculation de ces cultures à la peau de l'homme donnait également des résultats positifs.

Ces savants n'ont constaté aucune différence dans la coloration des bacilles obtenus par eux et de ceux de Ducrey. Ils n'ont pas vu pousser ces bactéries sur d'autres milieux nutritifs ni sur sang coagulé, mais ils ont constaté qu'elles se développaient assez bien sur le sérum sanguin.

La vitalité des bacilles se conservait durant 3 semaines; mais leur inoculation cutanée et intrapéritonéale aux animaux échouait complètement. Les bacilles se développaient tantôt sous forme de bâtonnets isolés, tantôt en chaînettes.

Le dernier travail qui traite des milieux de cultures du bacille de Ducrey est celui de Lenglet [3]; cet auteur y dit que dès ses premières recherches sur la culture du bacille chancrelleux sur le milieu préconisé par lui (gélose et peau humaine macérée), il avait noté la différence dans le développement des bactéries, qui tantôt donnaient des chaînettes et tantôt étaient isolées. Toutefois l'auteur ne dit rien sur les conditions qui provoquaient ces différences dans l'aspect des cultures.

Ainsi donc la cause du chancre mou est déjà nettement établie, et l'on est arrivé à cultiver son agent pathogène sur certains milieux et à démontrer, en inoculant les bacilles cultivés, que c'est précisément ce bacille qui provoque l'ulcère du chancre mou. Dans nos recherches actuelles, nous avons essayé de cultiver ce bacille sur d'autres milieux, d'établir quelles sont

1. *Soc. de dermat.*, 10 novembre 1898.
2. *Presse médicale*, 1901, n° 102.
3. *Ann. de dermat. et de syphil.*, 1901, n° 3.

les conditions qui rendent les animaux réfractaires à son action, et enfin de le rendre pathogène pour les animaux en affaiblissant l'immunité de ces derniers, et en exaltant en même temps la virulence du bacille de Ducrey.

En cherchant à ensemencer avec le pus du chancre mou divers milieux nutritifs, nous sommes arrivés à obtenir des cultures sur le sang coagulé, résultat que personne n'a encore obtenu jusqu'à présent. En ensemençant du sang fraîchement recueilli avec du pus du chancre mou, nous ne trouvions plus, au bout d'une demi-heure, de bactéries libres dans ce sang, malgré la richesse excessive du pus inoculé en bactéries libres ; ces dernières étaient très rapidement phagocytées et les leucocytes en étaient farcis. C'est pour cette raison, peut-être, que beaucoup d'auteurs ne réussirent pas à obtenir des résultats positifs en ensemençant le produit de sécrétion du chancre mou sur le sang fraîchement recueilli et coagulé. C'est également par ce fait que l'on doit probablement expliquer les résultats obtenus par Köbner[1], lequel a constaté, déjà en 1864, que le pus chancrelleux, mélangé avec 300, 100, et même 20 parties de sang, perdait toute contagiosité et ne pouvait plus reproduire le chancre par inoculation à l'homme; mais, comme les autres auteurs, Köbner n'a pas donné d'explication rationnelle du fait constaté.

Sans nous arrêter aux nombreux travaux parus en ces derniers temps sur la question des propriétés bactéricides du sang, nous allons directement passer à l'exposé de nos expériences.

Le sang d'un cobaye, recueilli aseptiquement et très rapidement, de façon à en éviter la coagulation, était versé dans des tubes stérilisés; chaque tube en recevait 7 à 8 c. c. Au bout de deux jours, ce sang ainsi laissé dans ces tubes stérilisés devenait un milieu nutritif parfait sur lequel les bactéries du chancre mou poussaient parfaitement. Son ensemencement était pratiqué de la manière suivante : sans toucher au chancre ni avec les mains ni avec les instruments, nous détachions l'enduit purulent de celui-ci à l'aide d'un jet d'eau stérilisée, continuée jusqu'à ce que le chancre fût complètement débarrassé de cet enduit. Nous ne nous servions, dans ce but, des pinces que lorsque le pus

1. Kobner, *Klinische ant experim. Mittheilungen aus dem Gebiet der Dermatologie und Syphiligraphie*, Erlangen, 1864.

séché se transformait en une croutelle que le courant était impuissant à détacher. Une fois l'ulcère bien détergé, on introduisait sous les bords de celui-ci une petite spatule en platine passée à la flamme; il suffisait d'appuyer très légèrement sur les bords de l'ulcère pour obtenir sur la petite spatule une quantité de liquide sérosanguinolent, qu'on transportait aussitôt dans les tubes contenant le sang.

Déjà au bout de 6 à 8 heures, on pouvait constater la présence dans le sang d'un grand nombre de bactéries dont l'aspect était absolument analogue à celui décrit par les auteurs qui ont cultivé la bactérie de Ducrey. Aussi pensons-nous que ce milieu nutritif peut aussi rendre de réels services au point de vue diagnostique, lorsqu'il s'agit de reconnaître rapidement si l'on est en présence d'une ulcération chancrelleuse ou non, et d'instituer le traitement approprié; ces cas peuvent se présenter, quoique rarement.

Vingt-quatre heures après, on obtient une culture très abondante de bacilles; le plus souvent ils sont disposés par groupes, plus rarement isolément, plus rarement encore en chaînettes composées de bacilles de même aspect. Si l'on fait des réensemencements des cultures tous les jours, on constate que le nombre de chaînettes diminue peu à peu à chaque nouvel ensemencement, et elles disparaissent complètement au bout de 10 à 12 séries d'ensemencement; on n'obtient alors que la variété de bacilles décrite par Ducrey. Par contre, si ces ensemencements successifs sont faits plus rarement, les chaînettes reparaissent; d'abord rares, elles augmentent en nombre lorsque la culture reste longtemps en repos. Ces chaînettes se composent de 3-10-15 bacilles et ressemblent complètement à ceux décrits par Unna.

Ainsi donc l'aspect de la culture du bacille du chancre mou dépend, à notre avis, de la durée et des conditions d'existence, ce dont nous fûmes encore plus convaincu lorsque nous arrivâmes à augmenter la virulence des bactéries du chancre simple : dans ce dernier cas, nous ne trouvions plus du tout de chaînettes. Il nous semble que ces chaînettes constituent un stade de passage aux formes d'involution.

Les ensemencements, faits avec les produits de sécrétion des ulcères chancrelleux, ont toujours reproduit une seule et même

variété bactérienne, et presque toujours à l'état pur; ce n'est que très rarement que nous avons rencontré des tubes souillés de staphylocoques ou de sarcines.

Conservées à la température de la chambre, ces cultures gardent leur vitalité pendant 5 à 6 semaines, tandis qu'à la température de 37° elles périssent beaucoup plus rapidement : au bout de trois semaines, il était impossible de les réensemencer.

Ayant obtenu une culture pure du bacille chancrelleux, nous avons commencé à faire des inoculations aux animaux, mais les résultats en furent d'abord négatifs, comme chez nos prédécesseurs. Nous cherchâmes alors à savoir dans quelles conditions et après combien de temps périssaient les bacilles introduits dans la cavité péritonéale, sous la peau et sous la dure-mère.

Nous avons choisi comme sujet d'expériences le cobaye; de même, pour les ensemencements, nous nous sommes servi du sang de cobaye, afin d'éviter l'action possible du sérum d'un animal d'une autre espèce sur l'organisme du cobaye.

Si l'on injecte une culture du bacille de Ducrey dans la cavité péritonéale ou sous la peau d'un cobaye, et si l'on recueille l'exsudat toutes les 10 ou 15 minutes, on voit que les bacilles sont rapidement phagocytés, et que les leucocytes se remplissent tous de bactéries, dont on trouve cependant encore beaucoup de libres. Avec le temps, ces derniers deviennent de plus en plus rares, et au bout de 24 heures on trouve difficilement des bactéries non englobées; les bacilles phagocytés semblent gonflés, très modifiés; quelques-uns d'entre eux sont déjà désagrégés en petites particules. Mais si le même exsudat est ensemencé sur un milieu de culture, on peut encore obtenir des résultats positifs au bout de 3 jours environ; après un laps de temps plus prolongé, l'exsudat péritonéal et sous-cutané ne permettait plus d'obtenir des cultures.

L'injection des cultures des bacilles chancrelleux sous la dure-mère de cobayes a donné des résultats analogues, c'est-à-dire la leucocytose et la phagocytose; de même que dans les cas précédents, il devenait impossible d'obtenir des cultures au bout de 3 jours; en d'autres termes, les bacilles succombaient dans le même laps de temps, mais sans tuer le cobaye.

Dans toutes nos expériences, nous avons constaté une chimiotaxie positive très intense; Krefting avait donc raison lors-

qu'il émettait l'hypothèse que les globules de pus semblent être le lieu d'élection où les bacilles se localisent de préférence. Nous devons ajouter, de notre côté, que c'est ainsi qu'on peut expliquer ce fait que les bacilles de Ducrey ne provoquent pas d'infection générale chez l'homme : ils pénètrent parfois jusqu'aux ganglions lymphatiques les plus proches, mais là ils provoquent un afflux excessif de leucocytes et aboutissent à la production des bubons : tandis que chez les animaux, dont les leucocytes réagissent encore plus énergiquement contre ces bactéries, l'infection ne va même pas jusqu'à provoquer des bubons.

Ayant établi que les bactéries chancrelleuses succombent dans l'organisme du cobaye au bout de 3 jours, nous avons un peu modifié nos expériences, soit en affaiblissant l'organisme du cobaye d'une façon ou d'une autre, soit en provoquant préalablement la leucocytose.

Ainsi, par exemple, en injectant dans la cavité péritonéale du bouillon stérilisé, 24 heures avant l'inoculation des bactéries de Ducrey, c'est-à-dire en provoquant une leucocytose préalable, nous avons pu nous convaincre que les bacilles chancrelleux succombent dans ces conditions au bout de 48 heures. D'autre part si, après l'injection, on plaçait les cobayes dans une chambre dont la température était de 4° à 5°, la leuco- et la phagocytose diminuaient d'intensité, et les bactéries succombaient après un laps de temps plus long (4 à 5 jours) ; si les cobayes étaient placés dans une chambre à 37°, on ne pouvait obtenir de cultures que dans les premières 24 heures, plus tard les ensemencements restaient stériles. En même temps, on notait aussi une différence notable dans l'exsudat qui, dans le premier cas, était liquide et pauvre en leucocytes, tandis que dans le second il était épais (aussi était-il difficile d'en recueillir dans la cavité abdominale) et extrêmement riche en leucocytes.

En injectant des bacilles dans la cavité abdominale de cobayes en inanition, on notait également une différence notable dans l'intensité de la leuco- et de la phagocytose, et la survie plus longue des bacilles chancrelleux dans l'organisme de l'animal inoculé.

Dans une autre série d'expériences, nous avons injecté dans la cavité abdominale de cobayes des bacilles tuberculeux, 15 jours avant de leur injecter les bacilles chancrelleux. Chez

ces cobayes, les bacilles de Ducrey survivaient dans la cavité abdominale environ 5 jours ; la leuco- et la phagocytose étaient moins marquées que chez les cobayes inoculés avec les bacilles chancrelleux, sans inoculation préalable des bacilles tuberculeux.

Ainsi donc on peut, en provoquant d'une façon quelconque une altération de l'organisme des cobayes, en diminuant la leuco et la phagocytose, on peut, disons-nous, obtenir une survie plus ou moins prolongée du bacille de Ducrey dans l'organisme animal. Ce fait n'est nullement en contradiction avec les observations cliniques où l'on voit le chancre mou prendre une allure chronique et grave lorsqu'il se développe chez des sujets tuberculeux ou affaiblis pour une cause ou une autre.

En étudiant la destruction des bactéries du chancre mou dans l'organisme animal dans différentes conditions, nous avons essayé d'augmenter la virulence de ces bactéries, en les faisant passer par différents animaux à l'aide de sacs de collodion. Ces passages ne nous ont fourni aucun résultat positif au point de vue de l'augmentation de la virulence ; nous n'avons pas non plus pu obtenir les résultats désirés par la diminution de la résistance de l'organisme des cobayes à l'aide de l'opium ou des toxines diphtéritiques.

Aussi, pour diminuer l'immunité des cobayes, avons-nous eu recours à l'acide lactique qui, comme on sait, a une action chimiotactique négative. En injectant, dans la cavité péritonéale d'un cobaye pesant 200 grammes, 4 gouttes d'acide lactique concentré, dilué dans 1 c. c. d'une solution physiologique de sel marin, en pratiquant une demi-heure plus tard au même animal une injection des cultures chancrelleuses, tandis que l'animal témoin ne recevait que l'acide lactique, nous avons observé les phénomènes suivants :

L'animal témoin présentait un malaise pendant une demi-heure après l'injection, se remettait bientôt et survivait ; le cobaye auquel nous avons fait une injection des cultures des bactéries chancrelleuses après celle d'acide lactique succombèrent au bout de 24 heures. En examinant à de courts intervalles l'exsudat péritonéal du cobaye qui avait reçu de l'acide lactique, on pouvait voir que la leucocytose et la phagocytose faisaient défaut jusqu'à la mort de l'animal. L'ensemencement sur le

milieu nutritif du sang du cœur de l'animal mort fournissait une culture pure de la bactérie chancrelleuse.

En injectant les cultures obtenues par l'ensemencement du sang du cœur aux autres cobayes et en diminuant chaque fois d'une demi-goutte la quantité d'acide lactique, nous sommes arrivé à avoir une culture des bacilles du chancre, mais d'une virulence telle qu'elle tuait les cobayes, même sans injection préalable d'acide lactique. Au début, la mort du cobaye auquel on avait injecté les cultures chancrelleuses survenait en 20 ou 30 heures; dans les passages ultérieurs, nous avons réussi à augmenter la virulence des cultures à tel point, que les cobayes succombaient en 12 à 20 heures après l'injection.

Dans toutes nos expériences, nous avons injecté une culture de 24 heures, tout entière, c'est-à-dire de 1 à 1,5 c. c., tout le reste en était représenté par un caillot sanguin.

En dehors de ce procédé que nous avons employé pour augmenter la virulence des bactéries chancrelleuses, nous avons eu recours à un autre, moins simple, mais aussi plus intéressant en ce qu'il permet de mettre en lumière les conditions de l'immunité en général. Ce procédé consiste dans l'emploi de l'antialexine.

Wassermann[1], qui s'est occupé de la question de l'immunité des animaux vis-à-vis des bacilles de la fièvre typhoïde, a attiré l'attention sur le fait que voici : il faut une dose moindre de cultures typhiques pour tuer un animal auquel on a fait une injection préalable d'antialexine, que pour celui qui ne reçoit qu'une injection de cultures typhiques seules.

Ce fait, très bien observé par Wassermann, est expliqué par cet auteur de la façon suivante : les substances bactéricides du sérum qui dépendent de l'alexine qui s'y trouve constamment, sont neutralisées par l'antialexine injectée; en d'autres termes, il dit que l'immunité est d'origine hématogène, et il nie ainsi son origine histogène; toutefois, en ce qui concerne cette dernière conclusion, il fait des restrictions, en disant que les leucocytes sont la source certaine mais non unique de l'alexine.

Bezredka[2], qui a fait des recherches sur le même sujet, a observé un fait qui a échappé à Wessermann. Bezredka a cons-

1. Wassermann, *Experimentelle Beiträge zur Kenntniss der natürlichen und Küntstlichen Immunität.*
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1901, n° 4.

taté qu'avec une injection préalable d'antialexine, suivie de celle des cultures typhiques dans la cavité péritonéale des animaux, on observe l'absence de leuco- et de phagocytose et du phénomène d'agglutination, ce qui veut dire que l'antialexine agit sur l'immunité par voie histogène et non pas par voie hématogène.

Il est possible que si ce fait a échappé à Wessermann, c'est que les bacilles de la fièvre typhoïde, étant très pathogènes, ne sont pas aussi énergiquement englobés par les phagocytes que le sont les bacilles non pathogènes du chancre mou.

En expérimentant avec ces derniers, on peut donc plus facilement voir la différence marquée dans les phénomènes de phagocytose, suivant qu'on faisait ou non usage de l'antialexine.

L'exsudat provenant d'un cobaye auquel on a fait une injection préalable d'antialexine ne contient que très peu de leucocytes et il ne survient pas de phagocytose, tandis que chez l'animal témoin on trouve déjà, 10-15 minutes après l'injection des cultures, de nombreux leucocytes entièrement farcis de bactéries : chez le premier il n'y a pas d'agglutination ; chez le second elle est très prononcée. Cette différence marquée dans l'aspect de l'exsudat commence à s'atténuer avec le temps. Au bout de 3-4 heures, on peut constater une légère leuco- et phagocytose et l'apparition de l'agglutination chez le premier des cobayes, de sorte que 6-8 heures après l'injection, l'aspect des exsudats de deux animaux en expérience devient identique (ces phénomènes s'observent si l'antialexine employée est faible).

Étant donnée cette action de l'antialexine qui provoque l'inhibition des fonctions de défense des éléments de l'organisme, on comprend qu'elle permet à l'agent infectieux qui y a pénétré d'y pulluler et d'y acquérir une plus grande virulence, et de tuer ainsi l'organisme à une dose inférieure aux doses mortelles normales.

Nous basant sur ces faits, nous nous sommes décidé à continuer nos expériences en faisant usage d'une antialexine plus forte.

L'antialexine que nous avons préparée était d'une énergie telle, que 2 parties paralysaient l'action hémolytique de 5 parties de sérum d'un cobaye vis-à-vis du sang d'un lapin. (Dans nos

expériences, 5 gouttes de sérum de cobaye dissolvaient complètement une goutte de sérum de lapin dans l'espace de 20 minutes. Le sang additionné de 2 gouttes d'antialexine ne provoquait pas cette hémolyse.)

En injectant 4 c. c. d'antialexine de cette énergie dans la cavité péritonéale d'un cobaye de 200 grammes, 10 minutes avant l'injection des cultures des bactéries chancrelleuses, nous avons obtenu la mort de l'animal au bout de 24 heures environ; les animaux témoins, dont l'un avait reçu une injection des cultures de ces bactéries, l'autre une injection d'antialexine, survécurent tous les deux. Les ensemencements sur le milieu indiqué, faits avec du sang du cœur du cobaye mort, ont donné une riche culture pure des bactéries chancrelleuses.

Par injections successives des cultures ainsi obtenues, tout en diminuant chaque fois la dose d'antialexine d'un 1/2 c. c., nous avons enfin obtenu une culture d'une virulence telle, qu'injectée à un cobaye de 200 grammes, elle le tuait en 16-24 heures et cela sans antialexine.

En terminant notre travail, nous nous permettons de tirer de nos expériences les conclusions suivantes :

1° Le sang coagulé et déposé pendant un certain temps, ou bien chauffé pendant une demi-heure jusqu'à 55° C., peut servir de bon milieu de culture pour les bactéries du chancre mou;

2° Étant donné que dans ce milieu les bactéries chancrelleuses se développent assez bien, il peut dans certains cas être utilisé par les cliniciens comme moyen adjuvant, pour établir plus rapidement le diagnostic différentiel;

3° Les bactéries chancrelleuses résistent un peu plus longtemps dans l'organisme des cobayes dont la résistance est affaiblie par différents agents;

4° On peut rendre les bactéries chancrelleuses virulentes pour le cobaye à l'aide de l'acide lactique ou de l'antialexine. L'injection d'une culture virulente dans la cavité péritonéale d'un cobaye tue cet animal en 16-24 heures;

5° L'antialexine, en inhibant la leuco- et la phagocytose, et en annulant l'agglutination, diminue l'immunité de l'organisme animal.

Nous pouvons donc dire que, grâce à l'acide lactique et à l'antialexine, nous avons réussi à augmenter la virulence d'une

bactérie qui, jusqu'à présent, n'était pas pathogène pour les animaux. En d'autres termes, nous avons réussi à obtenir en quelque sorte une nouvelle bactérie avec laquelle on peut faire les recherches expérimentales en général, sur l'immunité des animaux en particulier.

Quant à l'antialexine, elle acquiert un nouvel intérêt en ce sens qu'elle peut être utilisée comme un des moyens d'augmentation de la virulence des bactéries, considérées jusqu'à présent comme non pathogènes pour les animaux.

Nous profitons de l'occasion pour exprimer ici encore une fois toute notre gratitude à notre éminent maître, M. Metchnikoff, pour les conseils constants et bienveillants qu'il nous a prodigués au cours de notre séjour dans son laboratoire.

LA DIPHTÉRIE AVIAIRE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

VACCINATION — SÉROTHÉRAPIE

PAR M. C. GUÉRIN

Médecin-vétérinaire, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille.

La diphtérie aviaire a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Les différents auteurs qui se sont occupés de la question, tout en reconnaissant avec précision l'agent causal de cette affection, ont fourni des renseignements si contradictoires, des données si incomplètes sur les moyens efficaces à opposer à cette maladie, qu'une étude complémentaire s'imposait. C'est sur les instances d'un aviculteur distingué, M. Detroy, vice-président d'honneur de la Société des aviculteurs du Nord, que le Dr Calmette a bien voulu me charger de cette étude, commencée en mai 1899.

La question s'est montrée plus difficile que je ne pensais, et il m'a fallu de longs mois et de longs tâtonnements avant d'arriver aux résultats acquis à ce jour. La plupart des auteurs, en effet, Loir et Ducloux en particulier, se sont trouvés en présence de la maladie à forme septicémique; ils ont pu se procurer aisément un microbe déjà virulent. Dans la région du Nord, au contraire, la maladie sévit, presque exclusivement, sous sa forme chronique, et ce n'est que très exceptionnellement que j'ai pu avoir la chance d'autopsier des animaux morts de l'affection suraiguë. Même dans ces rares cas, je me suis trouvé en présence d'un microbe d'une très grande exigence quant aux conditions de vie, et d'une instabilité de virulence non moins accusée.

Tel microbe qui, en première culture, tuait le pigeon ou la poule, ne leur occasionnait aucun trouble en deuxième culture, même injectée à doses considérables.

Les caractères du microbe sont les suivants :

Cocco-bacille doué de mouvements oscillatoires, ne prenant

pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, ne coagulant jamais le lait dont la réaction n'est pas changée, ne poussant pas sur la pomme de terre naturelle acide, ne donnant pas d'indol, ne virant pas la gélose de Wurtz, facultativement aérobie ou anaérobie. Les cultures, surtout âgées, répandent une odeur spéciale.

Ce microbe ne peut donc rentrer dans le groupe des Pasteurella de Lignières, puisqu'il est mobile; il ne peut entrer non plus dans celui des Salmonella, type hog-choléra, puisqu'il ne pousse pas sur pomme de terre. J'insiste sur ce dernier caractère, car Loir et Ducloux ont mentionné dans leur mémoire la culture facile du microbe sur la pomme de terre.

Tous les échantillons que j'ai isolés, même celui envoyé par M. Loir et qui était identique aux miens, se sont toujours refusés à pousser sur ce milieu.

Les caractères particuliers de culture du microbe sur les différents milieux sont bien ceux indiqués par les auteurs : Loffler, Véranus Moore, Piana et Galli-Valerio. Les cultures ont ceci de commun, qu'elles ne sont jamais très riches; aussi nécessitent-elles beaucoup de soin pour leur entretien. C'est ainsi que le bouillon de bœuf ou de cheval peptonisé est à peine troublé légèrement par la culture en 24 heures; puis, très rapidement, la partie supérieure du liquide s'éclaircit, les microbes tombent au fond du tube où ils s'agglomèrent. J'ai d'abord cherché un milieu liquide plus favorable à la pullulation; les diverses substances employées : sucre, glycérine, bouillon de panse, etc., ne m'ont donné que des résultats médiocres.

Je me suis arrêté enfin au mélange convenable de bouillon frais peptonisé et de sérum de cheval, dans la proportion de 8 de bouillon pour 1 de sérum.

Dans un tel milieu, le microbe se développe beaucoup plus abondamment, et l'agglomération en grumeaux se fait plus tardivement.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Les microbes isolés des lésions chroniques de la poule, et cultivés dans ce milieu, se sont montrés parfois pathogènes pour les petits animaux, souris et moineau, mais jamais pour le le pigeon, la poule ou le lapin. J'ai réussi, cependant, à exalter rapidement la virulence par le procédé suivant : une petite

quantité de fausses membranes, recueillies soit dans le pharynx d'une poule malade, soit à l'autopsie dans les sacs aériens ou dans la plèvre, est triturée avec soin dans un verre, avec un peu d'eau stérilisée. J'ai choisi, de préférence, des fausses membranes provenant des sacs aériens ou de la plèvre, parce qu'elles contiennent presque toujours le microbe de la diphtérie, non associé à d'autres espèces banales. On inocule ensuite 1/4 de centimètre cube de ce triturat, non sous la peau, ce qui ne serait suivi d'aucun succès, mais dans le tissu conjonctif de la paupière inférieure d'un pigeon. 10 ou 12 heures après l'inoculation, le pseudo-œdème produit par le liquide injecté a pris une teinte blanc jaunâtre, par l'afflux d'une quantité considérable de leucocytes; l'œil se ferme à demi, devient pleureur et la mort survient dans les 36 à 48 heures.

A l'autopsie et au point d'inoculation, on trouve une véritable fausse membrane, blanc jaunâtre, ayant la consistance du fromage, assez dure, et dans laquelle pullule l'agent microbien.

Cette fausse membrane est de nouveau triturée dans un peu d'eau stérile, et on fait un second passage par le pigeon, dans les mêmes conditions.

Après une dizaine de passages effectués suivant ce procédé, la culture du microbe, pris dans le sang, dans le milieu bouillon-sérum, est assez virulente pour que 1/4 de centimètre cube tue à coup sûr en 18 heures le pigeon par inoculation sous-palpébrale. Cette même dose de virus, inoculée sous la peau du sternum, ne donne cependant pas encore la mort d'une façon régulière, et il m'a fallu faire 15 passages, par inoculation sous-palpébrale, avant d'arriver à la grande virulence que je cherchais. A ce moment, 1/8 de centimètre cube de culture en bouillon-sérum de 24 heures tue sûrement le pigeon en 15 à 18 heures par inoculation sous-cutanée. Les lésions observées à l'autopsie sont celles d'une septicémie à marche extrêmement rapide : tous les tissus, toutes les humeurs de l'organisme renferment un nombre considérable de microbes.

Un cinquième de centimètre cube de cette culture, inoculé sous la peau d'un lapin, le tue en 36 à 48 heures. Les passages par cet animal atténuent, progressivement, la virulence de la bactérie, non seulement pour le lapin, mais aussi pour le pigeon. Après 24 passages, le lapin mettait 5 jours à succomber, le

pigeon 6 à 7. J'ai essayé, alors, d'utiliser ces bactéries atténuées par les passages par le lapin, pour la vaccination du pigeon; mais à mesure que le microbe s'atténuait, j'ai vu réapparaître cette instabilité de virulence que j'avais constatée au point de départ; il est, d'ailleurs, probable que la difficulté de fixer la bactérie au point d'atténuation voulu aurait été très grande.

Le cobaye, complètement réfractaire à l'inoculation du microbe ordinaire, est tué, en 3 ou 4 jours, par l'inoculation, sous la peau, d'une quantité minime de culture virulente : un quart de centimètre cube.

Le moineau et la souris sont tués par des doses très petites de culture: une goutte suffit à donner la mort en 18 à 24 heures.

La poule est beaucoup plus résistante que le pigeon aux atteintes de la diphtérie aviaire.

Il paraît évident que cette grande résistance du poulet pour l'inoculation expérimentale a retardé jusqu'à maintenant l'étude complète de la maladie.

L'inoculation, sous la peau de la poule, d'une dose de culture virulente 4 et 6 fois mortelle pour le pigeon reste ordinairement sans effet.

L'inoculation dans le péritoine n'offre guère plus de garanties.

L'inoculation intra-veineuse est plus souvent suivie de succès: encore faut-il injecter une grosse dose, 1 c. c.; dans ce cas particulier, la mort, quand elle survient, arrive dans les 3 jours; l'autopsie montre tous les caractères d'une affection à forme septicémique, mais jamais on n'observe les lésions de la maladie naturelle. Ce n'est que dans quelques cas que certains inoculés se cachectisent vers le 12e ou 15e jour, et qu'à l'autopsie on trouve, dans une ou plusieurs des séreuses, les dépôts fibrineux jaunâtres qui accompagnent généralement l'évolution de la maladie naturelle.

J'ai cherché à exalter la virulence du microbe pour la poule, en employant le procédé qui m'avait si bien réussi pour le pigeon; je me suis servi pour cela de tout jeunes poussins, élevés par moi à la couveuse artificielle. J'étais ainsi absolument sûr de l'état de santé antérieur de mes sujets d'expérience.

Ces petits animaux se sont montrés aussi résistants à l'ino-

culation expérimentale que les adultes, et, malgré la diversité des modes d'inoculation, malgré les tentatives variées auxquelles je me suis livré, jamais je n'ai pu fixer absolument la virulence pour le poussin comme je l'avais fait pour le pigeon. Cette circonstance explique pourquoi, dans tous mes essais de vaccination, je me suis servi du pigeon comme animal d'expérience; chez lui, en effet, la virulence du microbe n'a jamais faibli. Ces essais, après avoir supporté l'épreuve rigoureuse du pigeon, ont pu être répétés, *a fortiori*, sur la poule, en raison même de la moins grande sensibilité de cet animal.

PATHOGÉNIE

C'est donc avec un microbe à virulence fixe et considérablement exaltée que j'ai déterminé la pathogénie de la maladie. Je suis arrivé à reproduire toutes les localisations graves de cette affection en laissant aux animaux d'expérience le soin de s'infecter seuls, par l'ingestion d'aliments ou de boissons mélangés à des cultures virulentes en bouillon-sérum.

Si les animaux sont jeunes ou peu résistants, comme les pigeonnaux, l'ingestion de tels aliments, souillés par les agents virulents, détermine chez eux, en 3 ou 4 jours, une forme septicémique, à marche suraiguë. A l'autopsie, tous les tissus renferment, en grande abondance, la bactérie spécifique. Si les animaux sont plus âgés, les symptômes varient suivant les localisations des lésions qui reproduisent, en tous points, celles de la maladie chronique.

On peut observer, dès les premiers jours du régime infectant, l'apparition dans la bouche ou le pharynx d'une ou plusieurs plaques pseudo-membraneuses, qui peuvent, quelques jours plus tard, être éliminées et disparaître, ou bien être le point de départ d'une lésion proliférante locale, se terminant ordinairement par la généralisation du microbe.

Chez d'autres sujets, on trouve des lésions étendues du poumon et des plèvres. Les poumons présentent des foyers de pneumonie caséeuse, des fausses membranes épaisses, blanc jaunâtre, tapissant les parois pleurales; on en voit parfois, même, recouvrant la muqueuse des sacs aériens.

Ces altérations sont, sans aucun doute, produites par la

chute dans la trachée d'une petite quantité d'eau de boisson contenant les germes virulents. Il suffit, en effet, d'introduire, avec une pipette, quelques gouttes de culture dans la trachée pour reproduire, en 5 ou 6 jours, des lésions identiques.

Le plus grand nombre, cependant, des animaux mis en expérience, présentent au bout d'un temps plus long, 3 semaines environ, de la dégénérescence du foie en foyers de nécrose, de couleur blanc jaunâtre, au début, et présentant, dans les derniers jours de la vie, une belle coloration vert foncé.

Exceptionnellement, l'ingestion a produit de la péritonite avec exsudats très abondants et très épais, dans lesquels pullulait l'agent spécifique.

Les excréments des animaux ainsi infectés sont virulents, et il est très facile d'en isoler la bactérie. Il suffit de reprendre une petite quantité de ces excréments par un peu d'eau stérile, et d'inoculer un 1/4 de centimètre cube de cette dilution sous la paupière inférieure d'un pigeon : la mort ne survient généralement pas du premier coup, mais il suffit de reprendre la fausse membrane, formée au point d'inoculation, et de recommencer l'injection sur un second pigeon; au bout de 3 ou 4 passages, on isole le microbe pathogène à l'état de pureté.

La virulence des excréments nous explique pourquoi la diphtérie à forme oculaire est si fréquente. En dehors des chances nombreuses de contagion directe, les poules et les pigeons s'inoculent eux-mêmes, grâce à l'habitude qu'ont ces animaux de se gratter fréquemment les paupières avec leurs doigts souillés. La contamination de l'eau de boisson est assurée par la chute des excréments dans les bacs ou abreuvoirs, ou même par les animaux malades porteurs de lésions dans les premières portions des voies digestive ou respiratoire.

On sait en effet que, pour boire, le pigeon plonge complètement le bec dans l'eau; il aspire, alors, une quantité assez grande de liquide dans son pharynx, le réflexe de la déglutition en introduit une portion dans l'œsophage, une autre est rejetée et retourne dans le récipient contenant le liquide, opérant ainsi un véritable rinçage de la bouche et du pharynx, et, par suite, la pollution de l'eau de boisson.

Le mode de contamination des pigeonneaux par l'engavement, signalé par Mégnin, est absolument confirmé par l'expérimen-

tation. Toutes les formes ou localisations de la maladie peuvent donc être reproduites, expérimentalement, par ingestion de produits virulents.

L'inoculation d'une quantité extrêmement petite de culture (1 à 4 gouttes) dans le péritoine ou la veine de l'aileron d'un pigeon provoque la mort en 15 ou 18 heures. L'inoculation sous-cutanée de 1/8 de centimètre cube l'amène dans la plupart des cas.

Cependant, quelques animaux résistent; il se forme au point d'inoculation une masse jaunâtre dure, qui se sèche à la longue, et qui finit par s'éliminer sous forme d'escharre. Je dirai plus loin quelle valeur a cette lésion au point de vue de l'immunité. Quoi qu'il en soit, ces animaux guérissent et ne présentent plus aucun malaise.

Tout se passe autrement si l'on fait, sous la peau ou dans le péritoine, *plusieurs injections, à quelques jours d'intervalle*, d'un microbe peu virulent, celui isolé d'un cas de maladie spontanée, par exemple; on voit alors l'animal, qui avait paru supporter la première injection sans malaise, devenir rapidement malade et présenter toutes les variations symptomatiques de l'affection naturelle. Le plus souvent ce sont les premières voies respiratoires et les yeux qui sont atteints d'abord, puis, rapidement, les séreuses se garnissent de leurs produits fibrineux jaunâtres, et la mort survient en 7 ou 8 jours : parfois les animaux semblent se remettre, mais la cachexie les saisit et la mort survient en 1 ou 2 mois.

Chez ces animaux, morts tardivement, l'autopsie ne révèle rien de particulier, sinon un état très accusé de maigreur. Le sang et les parenchymes ne renferment plus la bactérie spécifique.

J'ai pu, en procédant ainsi, obtenir expérimentalement, chez le pigeon, mais dans quelques rares cas seulement, des arthrites scapulo-humérales et huméro-radiales, bien connues des éleveurs de pigeons par les pertes que causent ces localisations, surtout chez le pigeon voyageur.

Il semble donc que, pour triompher de la résistance de l'organisme, il faille soumettre les animaux à une *contagion intime et prolongée*.

Cette contagion est, en tous points, réalisée dans les poulail-

lers ou les pigeonniers infectés, où les animaux sont en rapport constant avec les excréments que l'on sait contenir, en abondance, la bactérie spécifique.

En résumé, le pigeon s'est montré un animal d'expérience très précieux : il constitue, de ce fait, le réactif de choix pour la diphtérie aviaire. C'est sur lui que j'ai fait tous les essais de vaccination.

VACCINATION

La question de la vaccination contre la diphtérie aviaire a préoccupé, à juste titre, tous les auteurs qui ont étudié cette maladie. Tous ont abouti à des résultats peu satisfaisants, en raison même des difficultés que présente l'étude de cette affection.

Le mode de vaccination préconisé par MM. Loir et Ducloux, et qui avait réussi, entre leurs mains, chez la poule, ne m'a donné aucun résultat chez le pigeon. Bien plus, les animaux qui résistent à une inoculation virulente très petite, comme celle, par exemple, d'un fil virulent, placé en séton sous la peau, ces animaux, dis-je, guérissent leur lésion locale par escharre, ainsi que je l'ai indiqué, et, cette guérison achevée, ils n'ont acquis de ce fait aucune immunité ; ils succombent aussi régulièrement que les témoins à une inoculation plus sévère ; quant à l'interprétation à donner à ce résultat, elle reste encore obscure ; on pourrait cependant admettre qu'il fallut, pour conférer l'immunité contre ces affections septicémiques, mettre les virus atténués directement en rapport avec un très grand nombre de leucocytes en les introduisant soit dans la circulation générale, soit dans le péritoine ; l'inoculation sous la peau produisant, ainsi que je l'ai dit, un travail local de défense, suivi de la mort d'un certain nombre de leucocytes qui doivent, de ce fait, être éliminés ; l'organisme n'est donc que très peu influencé par ces injections sous-cutanées.

C'est partant de cette idée que j'ai fait des essais de vaccination, en inoculant les virus atténués dans le péritoine. Je puis dire que, tout de suite, les résultats ont été extrêmement démonstratifs, et m'ont conduit à pratiquer un mode de vaccination que je vais exposer.

Deux inoculations intrapéritonéales sont nécessaires pour

conférer au pigeon une immunité solide contre l'inoculation virulente de diphtérie aviaire.

L'injection dans le péritoine se fait de la façon suivante : l'opérateur saisit de la main gauche l'animal, en pliant les deux ailes au niveau de l'humérus, entre le pouce et l'index. Les trois autres doigts servant à maintenir le corps de l'animal horizontal. La patte droite est ramenée à la hauteur du bras et maintenue également avec le pouce et l'index de la même main. C'est donc le flanc droit qui se présente à l'opérateur. Ce détail a son importance, car, chez les volailles, le flanc gauche est occupé, en entier, par le gésier, organe résistant sur lequel pourrait se heurter la pointe de l'aiguille.

Avec la main droite, on arrache quelques plumes au niveau de l'abdomen et on enfonce l'aiguille de la seringue au milieu de l'espace compris entre la pointe du sternum et l'ischium. On peut enfoncer l'aiguille de 1 centimètre environ, chez le pigeon. La blessure de l'intestin est tout à fait problématique ; dans les quelques centaines d'injections que j'ai faites, je n'ai jamais observé le moindre accident.

La première injection est faite avec une culture virulente en bouillon-sérum de 24 heures, chauffée 1 heure à 55°.

A cette température, tous les agents virulents sont tués.

La quantité à injecter est de 1/2 c. c.

La seconde injection, qui se pratique 12 jours après la première, est faite avec une culture virulente en bouillon-sérum de 24 heures, chauffée 1 heure à 50°. Dans cet état, le microbe peut encore pousser, si on l'ensemence, mais il est suffisamment atténué pour pouvoir être toléré sans danger. La quantité à injecter est encore de 1/2 c. c.

Environ 12 ou 15 jours après cette seconde inoculation, l'animal possède une immunité assez solide pour pouvoir résister à l'inoculation sous-cutanée de 1/4 de c. c. de culture virulente, dose toujours mortelle.

Expérience. — 30 pigeons sont mis en expérience le 14 août 1901 ; 20 sont vaccinés suivant le *modus faciendi* décrit plus haut, 10 sont conservés comme témoins.

Le 14 octobre, les 30 animaux reçoivent sous la peau, chacun 1/4 de c. c. d'une culture virulente de 24 heures. Le 15 octobre, au matin, 9 des témoins sont morts, le dixième meurt le 17.

Des 20 vaccinés, 1 meurt de diphtérie aiguë, en même temps que les témoins; 4 succombent les 16, 17 et 18 octobre; les 15 autres restent bien portants. Il s'est formé, au point de l'inoculation virulente, une escharre qui a mis une vingtaine de jours à s'éliminer et toute trace a disparu. Ces pigeons ont été placés dans un pigeonnier séparé et, depuis, leur santé est restée parfaite.

Si l'on considère que jamais, dans la pratique, les animaux ne se trouvent dans des conditions de contagion aussi sévères, l'efficacité certaine de ce mode de vaccination apparaît nettement.

Bien que la saison fût avancée et que la diphtérie ait déjà fait son apparition dans les poulaillers depuis le milieu de septembre, j'ai voulu de suite essayer ce mode de vaccination sur le poulet. M. Detroy, l'aviculteur distingué, s'est empressé de mettre son élevage à ma disposition : 77 poulets, nés en 1901, et appartenant tous à des races de luxe et, par cela même, d'autant plus sensibles à la maladie, ont subi, les 17 et 23 septembre, les 2 inoculations : 1 c. c. de chacun des virus. J'ai reconnu depuis que ce délai de 6 jours, entre les 2 opérations, était insuffisant et je l'ai porté à 12 jours.

2 de ces animaux sont morts de diphtérie aiguë dans le courant du mois d'octobre; j'ai pu faire leur autopsie :

Ils avaient une quantité énorme de fausses membranes dans le pharynx. Le sang et les parenchymes renfermaient la bactérie spécifique, celle-là virulente d'emblée pour le pigeon. Les 75 autres animaux restants ont été envoyés dans un élevage contaminé et abandonnés aux intempéries.

A la date actuelle, 10 décembre, on n'a pas encore remarqué chez eux l'apparition de la maladie.

Sur les instances d'un autre aviculteur bien connu qui nous a puissamment aidé dans nos recherches, Mme Verstraete, au château de la Chapelle-en-Serval, j'ai procédé, dans son installation avicole, à la vaccination tardive de *cent soixante-cinq poulets;* je dis tardive, car sur ce nombre une quarantaine d'animaux présentaient déjà du catarrhe nasal, premier symptôme de la diphtérie.

La vaccination n'a pas paru aggraver immédiatement l'affection dont ils étaient porteurs. Nous ferons connaître quel sera leur sort ultérieur.

Il me paraît évident que la diphtérie aviaire, étant extrêmement commune dans les élevages, surtout parmi les jeunes sujets, il est de toute nécessité de procéder à la vaccination préventive aussitôt que les poussins sont déjà assez forts pour pouvoir la supporter sans danger. Je place l'époque la plus favorable à cette vaccination vers l'âge de 2 mois. Des poussins, élevés par moi et vaccinés à 15 jours, l'ont même supportée sans inconvénients. Les aviculteurs que j'ai cités ont mis, dès maintenant, leur élevage à ma dispositon pour les essais à faire au mois d'avril 1902, ce dont je les remercie sincèrement.

SÉROTHÉRAPIE

Dans l'ignorance où nous sommes du mode de production et d'action de la toxine du microbe de la diphtérie aviaire, il est facile de se convaincre qu'il ne faut pas songer, du moins pour l'instant, à l'obtention d'un sérum antitoxique.

Cependant l'existence de cette toxine ne peut être mise en doute, puisque la cachexie sans lésions d'autopsie est la terminaison la plus fréquente de la maladie chronique.

C'est donc en vue de produire un sérum préventif antimicrobien que j'ai entrepris l'immunisation de 2 chevaux suivant le *modus faciendi* employé pour obtenir les sérums anti-microbiens (injections intraveineuses et intrapéritonéales).

Un de ces chevaux, commencé le 5 avril 1901, a fourni, à la saignée du 5 novembre, un sérum d'un pouvoir préventif remarquable. Il suffit d'injecter sous la peau du pigeon 4 c. c. de sérum pour lui conférer une immunité assez solide pour lui permettre de résister parfaitement à l'inoculation, faite 24 heures après, de 1/4 de centimètre cube de culture virulente injectée dans le péritoine, procédé d'inoculation aussi sévère que l'injection intraveineuse.

2 c. c. de sérum suffisent, d'ailleurs, à préserver contre la même inoculation de contrôle, faite sous la peau.

Nous sommes donc en présence d'un second mode de vaccination active, basé sur la *séro-vaccination*, méthode dont la valeur avait été indiquée par Leclainche pour le *rouget du porc*.

Deux inoculations sont encore nécessaires, mais à 24 heures

d'intervalle seulement ; la première, qui se pratique sous la peau, consiste en une dose de sérum, variable suivant les espèces et leur sensibilité à l'égard de la diphtérie ; la seconde, qui est une injection virulente, se fait dans le péritoine, en suivant le manuel opératoire que j'ai indiqué.

Le sérum, dont le pouvoir préventif est si évident, s'est montré thérapeutiquement peu efficace jusqu'à présent. Des expériences en cours et qui feront l'objet d'une note ultérieure indiqueront la valeur curative de ce sérum.

CONCLUSIONS

I. — De tous les animaux de basse-cour, le *pigeon* est le plus sensible à la diphtérie aviaire. Chez lui, la virulence du microbe s'exalte et se fixe par les passages successifs.

II. — La transmission expérimentale de la diphtérie aviaire peut être réalisée facilement chez le pigeon, non seulement par inoculation, mais aussi par ingestion de produits virulents, en première ligne desquels il faut placer les déjections des malades.

III. — On peut conférer aux animaux sensibles à la maladie une immunité active solide par l'inoculation de virus atténué dans le péritoine. Ces injections faites sous la peau ne sont pas efficaces.

IV. — On peut obtenir avec le cheval un sérum préventif antimicrobien d'une grande efficacité, qui permet de conférer aux animaux sensibles une immunité active par *séro-vaccination*.

TABLE DES MATIÈRES

La sérothérapie de la septicémie gangréneuse, par MM. E. Leclainche et Ch. Morel 1
Sérum néphrotoxique, par M. le Dr Nefedieff 17
Les bactéries lactiques et leur importance dans la maturation du fromage, par M.-B. Chodat et N.-O. Hoffmann-Bang 37
Les théories parasitaires du cancer, par M. le Dr A. Borrel . . 49
Contribution à l'étude de l'origine de l'alexine des sérums normaux, par M. le Dr O. Gengou 68
Sur les propriétés physiques de la micelle albuminoïde, par M. le Dr S. Posternak 85
Sur la *Tristeza*, par M. J. Lignières 121
Recherches sur la coagulation du sang et les sérums anticoagulants, par MM. J. Bordet et O. Gengou 129
Contribution à l'étude de la fièvre typhoïde et de son bacille (3e partie). Procédé nouveau pour isoler le bacille typhique des eaux, par M. L. Remy 145
Recherches sur la vaccine expérimentale, par MM. A. Calmette et Guérin 161
Sur les propriétés physiques de la micelle albuminoïde, par le Dr Posternak 169
Étude de l'immunité dans l'infection typhique expérimentale, par M. le Dr Besredka 209
Contribution à l'étude de l'origine des alexines des sérums normaux, par M. le Dr O. Gengou 232
Variabilité de l'aptitude agglutinative du bacille d'Eberth, par M. le Dr Sacquépée 249
Infection secondaire par le *Bacillus mesentericus*, par M. le Dr Sacquépée 261
Sur les propriétés bactéricides du serum sanguin pendant les maladies, par M. le Dr Ostrianine 266
Sur la production de caséase par un streptothrix parasite, par MM. les Drs Bodin et Lenormand 279
Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens, par MM. les Drs J.

18659

Bordet et O. Gengou 289
Sur le mode d'action des sérums cytolytiques et sur l'unité de l'alexine dans un même sérum, par M. le Dr J. Bordet 303
Contribution à l'étude des hématozoaires endoglobulaires des reptiles, par M. le Dr P.-L. Simond 319
Recherches sur la digestion intracellulaire et les diastases des actinies, par M. F. Mesnil 352
Essais sur la nature chimique des tissus, par M. Etard ... 393
Bactériologie de l'ozène, 2e mémoire. Etiologie et prophylaxie, par M. le Dr F. Perez 409
Contribution à l'étude de la diarrhée des jeunes veaux, par MM. Lesage et Delmer 417
Rôle des trichocéphales dans l'affection de l'appendice iléo-cæcal, par M. J. Girard 440
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1900, par M. Eugène Viala 445
Sur les propriétés physiques de la micelle albuminoïde (3e mémoire), par M. le Dr Swigel Posternak 451
Étude sur l'immunité dans la fièvre récurrente, par MM. Sawtchenko et Melkich 497
Nouvelles recherches sur le ferment mannitique, par MM. U. Gayon et Dubourg 527
Sur les propriétés physiques de la micelle albuminoïde (4e mémoire), par M. S. Posternak 570
Études sur la tyrosinase, par M. C. Gessard 593
De la chimiotaxie négative des leucocytes des lapins injectés par la culture des bacilles du choléra des poules, par MM. A. Zilberberg et J. Zelioni 615
Note sur l'influence des microbes dans le développement des têtards, par Mme O. Metchnikoff 631
Essai de classification des réflexes non nerveux, par M. J. Massart 635
Recherches morphologiques et expérimentales sur le Trypanosome des rats, par MM. A. Laveran et Mesnil ... 673
Études sur la peste bovine, par MM. Nicole et Adil-Bey .. 715
Contribution à l'étude et à la classification des septicémies hémorragiques, par M. J. Lignières 734
Recherches sur les propriétés pathogènes de la trypsine et le pouvoir antitryptique du sérum des cobayes neufs

et immunisés, par le Dr P. Achalme..... 737
De la morphologie du sang des fœtus de lapin et de cobaye, et de l'influence de l'infection du sang de la femelle sur le sang de ses fœtus, par MM. Tchistovitch et Yourewitch 753
De l'immunité des pigeons et des cobayes vaccinés contre le charbon, et sur les propriétés de leur sérum, par M. J. de Nittis..... 769
Les antihémolysines naturelles, par M. Besredka..... 785
Sur le bacille pesteux et les injections intraveineuses massives de sérum Roux-Yersin dans le traitement de la peste, par M. Lignières..... 808
Existence des *anopheles* en grand nombre dans une région d'où le paludisme a disparu, par M. le Dr Et. Sergent. 811
Variété mélanogène du bacille pyocyanique, par M. C. Gessard..... 817
Recherches sur l'antispermotoxine, par M. W. Weichardt. 833
Contribution à l'étude de la purification spontanée du vagin chez les animaux, par M. le Dr Cahanesco..... 842
Sur les épidémies de peste bubonique à l'Assomption (Paraguay) et à Rosario (République Argentine), par M. L. Uriarte..... 857
Études sur la vieillesse, 1re p. Sur le blanchiment des cheveux et des poils, par M. Metchnikoff..... 865
De l'hémolysine streptococcique, par le Dr Besredka..... 880
Sur l'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux et des organismes vaccinés contre le vibrion cholérique par M. Levaditi..... 894
Contribution à l'étude de l'immunité des animaux vis-à-vis du chancre mou, par le Dr J. Himmel..... 928
La diphtérie aviaire, par M. C. Guérin..... 941
Tables du volume..... 953
Tables générales des volumes XI à XV..... 959

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TRAVAUX ORIGINAUX

Achalme	Trypsine et antitrypsine	737
Adil-Bey	Voir Nicolle.	
Besredka	Antihémolysines naturelles	785
—	Immunité dans l'infection typhique	209
—	Hémolysine streptococcique	880
Bodin et Lenormand	Caséase d'un streptothrix parasite	279
Bordet	Sérums cytolytiques	303
Bordet et Gengou	Coagulation du sang et sérums anticoagulants	129
— —	Substances sensibilisatrices dans les sérums	289
Borrel	Théories parasitaires du cancer	49
Cahanesco	Purification spontanée du vagin	842
Calmette et Guérin	Vaccine expérimentale	161
Chodat et Hoffmann-Bang	Bactéries lactiques et fromage	37
Delmer	Voir Lesage.	
Dubourg	Voir Gayon.	
Etard	Nature chimique des tissus	398
Gayon et Dubourg	Ferment mannitique	527
Gengou	Origine de l'alexine des sérums normaux	68
—	Même sujet	232
Gengou	Voir Bordet.	
Gessard	Variété mélanogène du bacille pyocyanique	817
—	Études sur la tyrosinase	593
Girard	Tricocéphale dans l'appendice iléo-cœcal	440
Guérin	Diphthérie aviaire	941
—	Voir Calmette.	
Himmel	Immunité dans le chancre mou	928
Hoffmann-Bang	Voir Chodat.	
Laveran et Mesnil	Trypanosome des rats	673
Leclainche et Morel	Sérothérapie de la septicémie gangréneuse	1
Lenormand	Voir Bodin.	
Lesage et Delmer	Diarrhée des jeunes veaux	417
Levaditi	Cytase dans le plasma	894
Lignières	Étude des septicémies hémorrhagiques	734
—	Sur la *Tristeza*	421
—	Bacille pesteux et traitement de la peste	898

MASSART	Classification des réflexes non nerveux	635
MELKICH	Voir SAWTCHENKO.	
MESNIL	Digestion chez les actinies	352
—	Voir LAVERAN.	
METCHNIKOFF (Mme)	Développement des têtards	631
METCHNIKOFF	Blanchiment des cheveux et des poils	865
MOREL	Voir LECLAINCHE.	
NEFEDIEFF	Sérum néphrotoxique	17
NICOLLE et ADIL-BEY	Peste bovine	715
NITTIS (DE)	Immunité des pigeons et des cobayes	769
OSTRIANINE	Propriétés bactéricides du sérum	266
PEREZ	Bactériologie de l'ozène	409
POSTERNAK	Propriétés physiques de la micelle albuminoïde	85
—	Même sujet 169, 451 et	510
REMY	Bacille typhique des eaux	145
SACQUÉPÉE	Agglutination du bacille d'Eberth	249
—	Infection secondaire par le *B. mesentericus*	261
SAWTCHENKO	Immunité dans la fièvre récurrente	497
SERGENT	Anopheles et paludisme	811
SIMOND	Hématozoaires endoglobulaires des reptiles	319
TCHISTOWITSCH et YOURIEWITSCH	Morphologie du sang des fœtus	753
VIALA	Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1900	445
WEICHARDT	Recherches sur l'antispermotoxine	883
YOURIEWITSCH	Voir TCHISTOWITSCH.	
ZILBERBERG et ZELIONI	Chimiotaxie chez les lapins	615

TABLE GÉNÉRALE DES TOMES X A XV

MÉMOIRES ORIGINAUX

ABBA. — Institut antirabique de Turin ..... XII 774
ACHALME. — Recherches bactériologiques sur le rhumatisme articulaire aigu..... XI 845
— Trypsine et antitrypsine ..... XV 737
ADIL BEY. — Voir NICOLLE.
BARDACH. — Fièvre récurrente..... XIII 305
BATZAROFF. — Pneumonie pesteuse expérimentale..... XIII 385
BÉCLÈRE, CHAMBON et MÉNARD. — Immunité vaccinale. XII, 837 et ..... XIII 82
BERTRAND (G). — Production biochimique du Sorbose.... XII 385
BESREDKA. — Leucocytose dans la diphtérie..... XII 305
— Immunité vis-à-vis de l'arsenic ... XIII, 49, 203 465
— Leucotoxine et système leucocytaire..... XIV 402
— Immunité dans l'injection typhique..... XV 209
— Les antihémolysines naturelles..... XV 785
— Hémolysine streptococcique..... XV 880
BEZANÇON et GRIFFON. — Réaction agglutinante dans les infections à pneumocoques..... XIV 449
BIENSTOCK. — Recherches sur la putréfaction..... XIII 854
— Rôle des bactéries de l'intestin ..... XIV 750
BODIN. — Bacille typhique dans le cidre..... XII 458
— et LENORMANT. — Caséase d'un streptothrix parasite. XV 279
BORDET. — Sérum antistreptococcique..... XI 177
— Agglutination et dissolution des globules rouges. XII 688
— Mécanisme de l'agglutination,..... XIII 225
— Agglutination et dissolution des hématies.... XIII 273
— Sérums hémolytiques et antitoxines ..... XIV 257
— Sérums cytolytiques..... XV 303
— et GENGOU. — Coagulation du sang, et sérums anticoagulants ..... XV 129
— Substances sensibilisatrices dans les sérums ..... XV 289
BORREL. — Théories parasitaires du cancer ..... XV 49
— Voir ROUX.
BOSSAERT. — Agglutination des microbes..... XII 857
BOULANGER. — Action des levures de bière sur le lait ..... XI 720

CAHANESCO. — Purification spontanée du vagin..... XV 842
CALMETTE (A.) — Venin et sérum antivenimeux..... XI 214
— Immunisation contre les venins ..... XII 343
— Stérilisation des eaux par l'ozone ..... XIII 344
— et SALIMBENI. — La peste d'Oporto en 1899. XIII 865
— et GUÉRIN. — Vaccine expérimentale..... XV 161
CAMUS et GLEY. — Immunité contre le sérum d'anguille.. XIII 779
CANTACUZÈNE. — Destruction des vibrions dans l'organisme. XII 273
— Spirillose des oies ..... XIII 529
— Globules rouges et sérum hémolytique .. XIV 378
CARRÉ et FRAIMBAULT. — Peste bovine chez le porc ..... XII 848
CARRIÈRE. — Toxines et antitoxines du tube digestif .... XIII 435
CHAMBON. — Voir BÉCLÈRE.
CHANTEMESSE et RAMOND. — Paralysie ascendante chez les aliénés XII 574
CHAVIGNY. — Gangrène gazeuse subaiguë..... XI 860
CHODAT et HOFFMANN BANG. — Bactéries lactiques et fromages. XV 737
CHRISTMAS (DE). — Lettre au sujet du jequérity ..... XI 94
— Le gonocoque et sa toxine ..... XI 609
CLAUDIUS. — Méthode de coloration..... XI 332
COBBETT. — Physiologie du bacille diphtérique ..... XI 251
COLARD. — Caséine comme agent pyogène..... XIII 735
CRENDIROPOULO. — Ulcère de l'Yemen..... XI 784
DANYSZ. — Constitution des toxines ..... XIII 581
— Un microbe pathogène pour les rats..... XIV 193
— Immunisation de la bactérie charbonneuse contre le sérum de rat..... XIV 641
DEBRAND. — Nouvel appareil de contention ..... XIV 249
— Procédé de culture du bacille du tétanos.... XIV 758
DELÉARDE. — Étude de l'alcoolisme expérimental..... XI 837
DELEZENNE. — Sérums névrotoxiques..... XIV 686
DELMER. — Voir LESAGE.
DEMBINSKI. — Phagocytose du B. de Koch chez le pigeon. XIII 426
DEUTSCH. — Origine des anticorps typhiques..... XIII 689
DIENERT. — Fermentation du galactose et accoutumance des levures ..... XIV 139
DOPTER. — Phagocytose dans la dysenterie ..... XV 813
DUBOURG. — Voir GAYON.
DUCLAUX. — Lois générales de l'action des diastases ..... XII 416
ELMASSIAN. — Bacille des voies respiratoires ..... XIII 621
— Voir MORAX.
ETARD. — Chlorophylles..... XIII 456
— Nature chimique des tissus..... XV 397

FERREIRA DOS SANTOS. — Institut Pasteur de Rio-de-Janeiro. XII 541
FRAIMBAULT. — Voir CARRÉ.
FRANTZIUS. — Statistique de la station Pasteur de Tiflis.... XI 790
GABRITCHEWSKY. — Réponse à M. Metchnikoff..... XI 238
GARNIER. — Destruction des microbes dans la cavité péritonéale XI 767
GAYON et DUBOURG. — Ferment mannitique..... XV 527
GENGOU. — Immunité des organismes cellulaires ..... XII 465
— Agglutinines et lysines..... XIII 642
— Origine de l'alexine des sérums normaux. XV, 68 et 232
— Voir BORDET.
GESSARD. — Études sur la tyrosinase..... XV 593
— Variété mélanogène du bacille pyocyanique.. XV 817
GHEORGIEWSKY. — Immunité vis-à-vis du B. pyocyanique. XIII 298
GIRARD. — Tricocéphale dans l'appendice iléo-cœcal ..... XV 440
GLEY. — Voir CAMUS.
GRIFFON. — Voir BEZANÇON.
GRIMBERT. — Action du B. coli et du B. d'Eberth sur les nitrates. XIII 67
— et LEGROS. — Bacillus lactis aerogenes et pneumobacille de Friedlænder..... XIV 479
GRUNBAUM. — Un mot sur l'histoire du sérodiagnostic..... XI 670
GUÉRIN. — Diphtérie aviaire..... XV 941
— Voir CALMETTE.
HALBAN. — Action sporicide du sérum..... XII 417
HANKIN. — Propagation de la peste..... XII 705
HAVELBURG. — Recherches expér. sur la fièvre jaune.... XI 515
HÉBERT. — Voir NICOLLE.
HEYMANS et MASOIN. — Hyposulfite de soude et dinitriles normaux ..... XI 161
HIMMEL. — Immunité dans le chancre mou ..... XV 928
HOFFMANN-BANG. — Voir CHODAT.
JOUKOWSKY. — Toxine létanique et système nerveux central. XIII 464
KAYSER. — Nutrition intracellulaire des levures ..... XIV 605
KHODJABASCHEFF. — Action du sérum sanguin sur le vaccin. XIV 102
KLECKI (DE). — Pathologie de l'appendicite..... XII 480
KROMPECHER. — Méthode de Landerer et virulence des bacilles tuberculeux ..... XIV 723
LABORDE. — *Eurotiopsis Gayoni*..... XI 1
— Azote contenu dans le vin..... XII 517
— et MOREAU. — Dosage de l'acide succinique..... XIII 657
LAMBOTTE et MARÉCHAL. — Agglutination du B. charbonneux. XIII 637

LATAPIE. — Appareil à récolter le sérum sanguin..... XIV 106
LAURENT. — Maladies des plantes..... XIII 1
LAVERAN et MESNIL. — Trypanosome des rats..... XV 673
LEBELL. — Cas de pseudo-rage chez un malarique..... XIV 46
LECLAINCHE et MOREL. — Inoculation du virus rabique dans le cerveau..... XIII 513
— — Sérothérapie de la septicémie gangréneuse..... XV 1
— et VALLÉE. — Charbon symptomatique, XIV, 202 et 513
— — Vibrion septique et *B. Chauvœi*. XIV 590
LEDOUX-LEBARD. — Bacille de la pseudo-tuberculose..... XI 909
— — Bacille pisciaire et tuberculose de la grenouille..... XIV 535
LEGROS. — Voir GRIMBERT.
LENORMAND. — Voir BODIN.
LESAGE et DELMER. — Diarrhée des jeunes veaux..... XV 417
LEVADITI. — État de la cytase dans le plasma..... XV 894
LEVIN. — Microbes dans les régions arctiques..... XII 558
LIGNIÈRES. — Sur la *Tristeza*..... XV 121
— Étude des septicémies hémorrhagiques..... XV 734
— Bacille pesteux et traitement de la peste.... XV 818
LINDEMAN. — Action de certains poisons rénaux..... XIV 49
LŒWENBERG. — Une sarcine pathogène..... XIII 358
MADSEN. — Constitution du poison diphtérique.. XIII, 568 et 801
— Voir SALOMONSEN.
MALFITANO. — Protéolyse chez l'*aspergillus niger*..... XIV 60
— Protéose chez l'*aspergillus niger*..... XIV 420
MALVOZ. — Agglutination par les substances chimiques... XI 582
— Agglutinines spécifiques dans les cultures. XIII 630
MARCHOUX. — Le paludisme au Sénégal..... XI 640
— Pneumocoque dans la maladie du sommeil. XIII 193
MARÉCHAL. — Voir LAMBOTTE.
MARIE. — Recherches sur la toxine tétanique..... XI 591
MARTEL. — Le charbon du chien..... XIV 13
MARTIN. — Production de la toxine diphtérique..... XII 26
MASSART. — Classification des réflexes non nerveux..... XV 634
MATCHINSKI. — Atrophie des ovules chez les mammifères. XIV 113
MAZÉ. — Fixation de l'azote dans les légumineuses..... XI 44
— Microbe des nodosités..... XII, 1 et 128 et XIII 145
— Influence de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal sur le développement du maïs..... XIV 26
— Rôle de l'oxygène dans la germination..... XIV 350
MELKICH. — Voir SAWTCHENKO.

Ménard. — Voir Béclère.
Mesnil. — Sérum préventif contre le rouget..... XII 481
— Digestion chez les actinies..... XV 352
— Voir Laveran.
Metalnikoff. — Spermotoxine et antispermotoxine... XIV, et 577
Metchnikoff. — Réponse à M. Gabritchewsky..... XI 245
— Influence de l'organisme sur les toxines X, 801 et XI, 81 et 263
— Résorption des cellules..... XII 737
— Sur les cytotoxines..... XIV 369
— Blanchiment des cheveux et des poils.... XV 865
— et Besredka. — Action de l'hémotoxine sur l'homme XIV 402
Metchnikoff (Mme). — Microbes et développement des têtards XV 630
Metin. — Bacille de la diphtérie dans les organes..... XI 596
— Élimination des bactéries par le rein et le foie. XIV 415
— Quelques expériences sur la peste à Oporto... XIV 597
Mollard et Regaud. — Myocarde dans l'intoxication diphtérique..... XI 97
Morax et Elmassian. — Toxine diphtérique sur les muqueuses. XI 210
Moreau. — Voir Laborde.
Morel. — Voir Leclainche.
Napias (Mlle). — Action de la bactéridie charbonneuse sur les hydrates de carbone..... XIV 233
Nefedieff. — Sérum néphrotoxique..... XV 17
Nicolle (Ch.). — Recherches sur la substance agglutinée. XII 161
— Bactériologie de la verruga du Pérou... XII 591
— et Hébert. — Angines à bacille de Friedlænder XI 67
— — Bacille isolé de la vase de la Seine. XI 80
Nicolle et Adil-Bey. — Peste bovine..... XIII, 319 et XV 715
— Malaria des bovidés..... XIII 337
Noury-Bey. — Recherches sur le bouton d'Alep..... XI 777
Nikolsky. — Charbon intestinal..... XIV 794
Nittis (de). — Immunité des pigeons..... XV 769
Nocard. — Tuberculose pulmonaire et tuberculose aviaire XII 561
— et Roux. — Microbe de la péripneumonie..... XII 240
Nolf. — Contribution à l'étude des sérums antithématiques XIV 297
— Le mécanisme de la globulolyse..... XIV 656
Noury-Bey. — Épidémie de peste à Djeddah..... XI 604
Nowak. — Altérations pathol. produites par les venins.. XII 369
Ossipoff. — Intoxication botulinique..... XIV 769
Ostrianine. — Propriétés bactéricides du sérum ..... XV 266

PAMPOUKIS. — Institut Pasteur hellénique d'Athènes..... XII 404
— Quelques observations sur la rage..... XIV 111
PÉRÉ. — Combustion biologique du propylglycol..... XI 600
— Fermentation lactique des corps sucrés..... XII 63
PEREZ. — Bactériologie de l'ozène..... XIII, 937 et XV 409
PIERALLINI. — Phagolyse dans la cavité pritonéale..... XI 308
PODBELSKY. — Immunité vis-à-vis du *bacillus subtilis*..... XII 427
PODWYSSOTSKY et TARAKHOUNINE. — Plasmolyse chez les bactéries..... XI 501
POSTERNAK. — Propriétés physiques de la micelle albuminoïde. XV, 85, 169, 451 et 510
POTTEVIN. — Vaccinations en 1896 à l'Institut Pasteur..... XI 336
— — 1897 — XII 301
— — 1898 — XIII 518
— Saccharification de l'amidon..... XIII 665
— Maltodextrine..... XIII 728
— Sur l'isomaltose..... XIII 796
RAMOND. — Voir CHANTEMESSE.
RECHTER (de). — Pouvoir pénétrant du formol..... XII 447
REFIK-BEY. — La peste bovine en Turquie..... XIII 596
REGAUD. — Voir MOLLARD.
REMLINGER. — Hérédité de l'immunité contre le B. d'Eberth. XIII 129
— et SCHNEIDER. — Étude du bacille typhique..... XI 55
— — Fièvre typhoïde expérimentale. XI 829
REMY. — Fièvre typhoïde et son bacille..... XIV, 555 et 705
— Bacille typhique des eaux..... XV 145
ROLANTS. — Fermentation des figues de Barbarie..... XIII 452
RONALD ROSS. — Moustiques et paludisme..... XIII 136
ROUX et BORREL. — Tétanos cérébral..... XII 225
— — Voir NOCARD.
SABOURAUD. — La séborrhée grasse et la pelade..... XI 134
SACQUÉPÉE. — Agglutination du bacille d'Eberth..... XV 249
— Infection secondaire par le *B. mesentericus*. XV 261
SALIMBENI. — Sur l'agglutination..... XI 277
— Destruction des microbes sous la peau des animaux hypervaccinés..... XII 192
— Voir CALMETTE.
SALMON. — Infection dans la vaccine et la variole..... XI 289
SALOMONSEN et MADSEN. — Immunisation active dans la diphtérie..... XI 315
— — Reproduction de l'antitoxine... XII 763
— — Immunisation contre la diphtérie XIII 262
SANARELLI. — Étiologie et pathologie de la fièvre jaune. XI, 433 et 673

SANARELLI. — Immunité et sérothérapie de la fièvre jaune. XI 375
— Sérum préventif et curatif de la fièvre jaune. XII 348
SANGUINELI. — Comparaison de divers ferments de l'amidon. XI 264
SAWTCHENKO. — Étude sur l'immunité..... XI 865
— Immunité dans la fièvre récurrente..... XV 497
SCHIROKICH. — Maturation des fromages..... XII 400
SCHNEIDER. — Fièvre typhoïde d'origine hydrique..... XII 402
— Voir REMLINGER.
SERGENT. — Anopheles et paludisme..... XV 811
SICARD. — Voir WIDAL.
SIEDLECKI. — Coccidie de la seiche..... XII 799
SILBERSCHMIDT. — Nouveau streptothrix pathogène..... XIII 841
SIMOND. — Évolution des sporozoaires du genre *coccidium*. XI 545
— Propagation de la peste..... XII 625
— Hématozoaires endoglobulaires des reptiles... XV 319
SPRONCK. — Chauffage du sérum antidiphtérique..... XII 696
— Préparation de la toxine diphtérique..... XII 701
STOUDENSKY. — Action antitoxique du carmin..... XIII 126
TARANOUKHINE. — Voir PODWYSSOTSKY.
TCHISTOWITCH. — Immunisation contre le sérum d'anguille. XIII 406
— Épidémie de peste à Slobovka..... XIV 132
— Phagocytose dans une infection mortelle.. XIV 802
— et YOURIEWITSCH. — Morphologie du sang des fœtus. XV 753
THOMASSEN. — Nouvelle septicémie des veaux..... XI 523
TRÉTROP. — Maladie des cygnes coscoroba..... XIV 224
TRILLAT. — Étude des eaux d'infiltration..... XIII 444
TROLARD. — Statistique de l'institut Pasteur d'Alger..... XIV 190
TSIKLINSKI (Mlle). — Mucédinées thermophiles..... XIII 500
— Microbes thermophiles des eaux thermales. XIII 788
VALLÉE. — Bile et virus rabique..... XIII 506
— Voir LECLAINCHE.
VAUDIN. — Éléments minéraux et phosphates du lait..... XI 541
VAN LAER. — Bières à double face..... XIV 82
VIALA (E.) — Statistique de l'Institut Pasteur en 1899.... XIV 487
— — — — 1900 .... XV 445
VINCENT. — Leucocytes dans la malaria..... XI 891
— Microbes saprophytes et pathogènes..... XII 785
— Angine à bacilles fusiformes..... XIII 609
WEHRMANN. — Sang et bile des anguilles et des vipères... XI 810
— Venin des serpents..... XII 510
WEICHARDT. — Recherches sur l'antispermotoxine..... XV 883

WIDAL. — Réponse à M. Grunbaum..... XI 671
WIDAL et SICARD. — Sérodiagnostic et réaction agglutinante. XI 353
WYSOTROWICZ et ZABOLOTNY. — Sur la peste bubonique..... XI 663
YERSIN. — Sur la peste bubonique..... XI 81
YOURIEWITSCH. — Voir TCHISTOWITSCH.
YVON. — Sur l'amylase..... XIII 523
ZABOLOTNY. — La peste en Mongolie orientale..... XIII 833
— Voir WYSOKOWICZ.
ZILBERBERG et ZELIONI. — Chimiotaxie chez le lapin..... XV 615

REVUES CRITIQUES

BESREDKA. — La question de la leucocytose..... XI 726
— Pouvoir bactéricide des leucocytes..... XII 607
DUCLAUX. — Sur l'action des diastases..... XI 793
— Sur le monopole de l'alcool..... XII 73
— Sur l'origine des *Saccharomyces*..... XII 156
— Sur les proenzymes..... XII 407
— Sur les eaux de Paris..... XIV 816
MAZÉ. — Procédés d'épuration des eaux..... XIV 632
METCHNIKOFF. — La peste bubonique..... XI 737
MOUTON. — Diastases inorganiques..... XIV 571
NOLF. — Sur les nucléines..... XII 361
— Sur les albumines..... XII 471
— Sur les albuminoïdes..... XII 547
— Globulolyse et pression osmotique..... XIV 492

REVUES ET ANALYSES

BUCHNER. — Fermentation alcoolique sans levure..... XI 287
HIEPE. — Fermentation fractionnée du sucre de canne.... XI 348
VOGES. — Microbes de la septicémie hémorragique..... XI 342

TABLE ANALYTIQUE DES SUJETS TRAITÉS

DANS LES TOMES XI A XV

Acide succinique, dosages, XIII, 657.

Agglutination, XI, 277 et 353 ; — dans les infections à pneumocoques, XIV, 449 ; — des globules rouges, XII, 638 ; XIII, 273. — Mécanisme, XIII, 225 ; — des microbes, XII, 857 ; — et lysines, XIII, 642 ; — du bacille charbonneux, XIII, 637 ; — par les substances chimiques, XI, 582 ; — étude de la substance agglutinée, XI, 161 ; — du bacille d'Eberth, XV, 249.

Agglutinines, XIII, 630.

Albumines, XII, 471.

Albuminoïdes, XII, 547.

Alcool (monopole de l'), XII, 73.

Alcoolisme expérimental, XI, 837.

Alexines des sérums normaux, XV, 68 et 232.

Amylase, XIII, 523.

Angines à bacilles de Friedlaender, XI, 67 ; — à bacilles fusiformes, XIII, 609.

Antihémolysines naturelles, XV, 785.

Antispermotoxine, XV, 883.

Antitoxines, XIV, 257 ; — du tube digestif, XIII, 435 ; — action antitoxique du carmin, XIII, 126.

Appareil de contention, XIV, 249 ; — à récolter le sérum sanguin, XIV, 606.

Appendicite, XII, 480.

Arsenic (immunité vis-à-vis de l'), XIII, 49, 203, 465.

Azote du vin, XII, 517 ; — (fixation de l'-), XI, 44.

Bacille aérogène, XIV, 479.

Bacille diphtérique, XI, 251.

Bacille pesteux, XV, 818.

Bacille du tétanos, méthode de culture, XIV, 758.

Bacille typhique dans le cidre, XII, 458 ; XI, 55 ; XIV, 555, 705 ; — des eaux, XV, 145.

Bacille tuberculeux (virulence du), XIV, 723.

Bacille des voies respiratoires, XIII, 621.

Bactéries de l'intestin, XIV, 750 ; — lactiques dans le fromage, XV, 37 ; — diphtériques dans les organes, XI, 596 ; — (élimination des) par le rein et le foie, XIV, 415.

Bactéridie charbonneuse, action sur les sucres, XIV, 233.
Bières à double face, XIV, 82.
Blanchiment des cheveux et des poils, XV, 865.
Bouton d'Alep, XI, 777.
Cancer (théories parasitaires du), XV, 49.
Carmin (action antitoxique du), XIII, 126.
Caséase dans un streptothrix, XV, 279.
Caséine, agent pyogène, XIII, 735.
Cavité péritonéale (destruction des microbes dans la), XI, 767.
Charbon du chien, XIV, 15 ; — intestinal, XIV, 794.
Charbon symptomatique, XIV, 202, 513, 590.
Cheveux (blanchiment des), XV, 865.
Chlorophylles, XIII, 456.
Chimiotaxie chez le lapin, XV, 615.
Coccidie de la seiche, XII, 799.
Coccidium, évolution, XI, 545 ; XV, 319.
Coloration (méthodes de), XI, 332.
Cytase, son état dans le plasma des animaux, XV, 894.
Cytotoxines, XIV, 369.
Destruction des microbes sous la peau des animaux hypervaccinés, XII, 192.
Diarrhée des jeunes veaux, XV, 417.
Diastases, lois générales de l'action, XI, 793 ; XII, 416 ; — inorganiques, XIV, 571.
Digestion chez les actinies, XV, 352.
Dinitriles normaux, XI, 161.
Diphtérie aviaire, XV, 941.
Diphtérie dans les organes, XI, 596 ; — action sur le myocarde, XI, 97.
Eaux d'infiltration, XIII, 444 ; — de Paris, XIV, 816 ; — épuration, XIV, 632.
Eurotiopsis Gayoni, XI, 1.
Fermentation alcoolique sans levure, XI, 237 ; — fractionnée, XI, 348 ; — des figues de Barbarie, XIII, 452.
Fermentation lactique des corps sucrés, XII, 63.
Ferment mannitique, XV, 727.
Ferments de l'amidon, XI, 264.
Fièvre jaune, XI, 515 ; — étiologie, pathologie et thérapeutique, XI, 433, 673, 753 ; XII, 348.
Fièvre récurrente, XIII, 305 ; — (immunité contre la), XV, 497.
Fièvre typhoïde (immunité dans la), XV, 209 ; expérimentale, XI, 829 ; — d'origine hydrique, XII, 402.

Formol, son pouvoir pénétrant, XII, 447.
Fromages (bactéries lactiques et), XV, 37; — maturation, XII, 400.
Gangrène gazeuse subaiguë, XI, 860.
Globulolyse, son mécanisme, XIV, 492, 656.
Gonocoque et sa toxine, XI, 609.
Hémolysine streptoccocique, XV, 880.
Hémotoxine, action sur l'homme, XIV, 402.
Hyposulfite de soude, XI, 161.
Infection par le *B. mesentericus*, XV, 261; — dans la vaccine et la variole, XI, 289.
Immunité vaccinale, XII, 337, et XIII, 81; — vis-à-vis de l'arsenic, XIII, 49, 203, 465; — dans l'infection typhique, XV, 209; — contre le sérum d'anguille, XIII, 406, 779; — de la bactérie charbonneuse contre le sérum de rat, XIV, 641; — des organismes cellulaires, XII, 465; — vis-à-vis du bacille pyocyanique, XIII, 298; — des pigeons et des cobayes, XV, 769; — vis-à-vis du *bacillus subtilis*, XII, 427; — (hérédité de l'), contre le bacille d'Eberth, XIII, 129; — contre la diphtérie, XI, 315; XII, 763; XIII, 262; — contre la fièvre jaune, XI, 753; — (études sur l'), XI, 865; — contre la fièvre récurrente, XV, 497; — vis-à-vis du chancre mou, XV, 928.
Intestins (bactéries des), XIV, 750.
Intoxication botulinique, XIV, 769.
Isomaltose, XIII, 796.
Jéquirity, XI, 94.
Lait, éléments minéraux et phosphatés, XI, 541.
Leucocytose, histoire, XI, 726; XII, 607; — dans la diphtérie, XII, 305.
Leucotoxine et système leucocytaire, XIV, 402.
Levure de bière dans le lait, XI, 720; — accoutumance au galactose, XIV, 139; — nutrition intracellulaire, XIV, 605; — (origine des), XII, 156.
Maïs, influence de l'azote nitrique et de l'azote ammoniacal, XIV, 26.
Maladies des plantes, XIII, 1; — des cygnes *coscoroba*, XIV, 224.
Malaria (leucocytes dans la), XI, 891.
Malaria des bovidés, XIII, 337.
Maltodextrine, XIII, 728.
Micelle albuminoïde, ses propriétés physiques, XV, 85, 169, 451, 510.
Microbes des nodosités des légumineuses, XII, 1, 128; XIII, 145.
Microbes des régions arctiques, XIII, 558; — isolé de la vase de la Seine, XI, 80; thermophiles des eaux thermales, XIII, 500, 788; — saprophytes et pathogènes, XII, 785.

Morphologie du sang des fœtus, XV, 753.
Moustiques et paludisme, XIII, 136; XV, 811.
Nitrates, action des bacilles du colon et du bacille d'Eberth, XIII, 67.
Nucléines, XII, 361.
Ovules (atrophie des), XIV, 113.
Oxygène, rôle dans la germination, XIV, 350.
Ozène, bactériologie, XIII, 937; XV, 409.
Paludisme au Sénégal, XI, 640; — et moustiques, XIII, 136; — et *anopheles*, XV, 811.
Paralysie ascendante, XII, 574.
Pelade, XI, 134.
Péripneumonie, son microbe, XII, 240.
Peste, XI, 737; — (pneumonie dans la), XIII, 385; — la peste à Oporto, XIII, 865; XIV, 597; — (propagation de la), XII, 705; — (traitement de la), XI, 81; XI, 663; XV, 818; — épidémie à Djeddah, XI, 604; — propagation, XII, 625; — à Slobovka, XIV, 132; — en Mongolie orientale, XIII, 833.
Peste bovine, XII, 848; XIII, 319; XV, 765; — en Turquie, XIII, 596.
Phagocytose du bacille de Koch chez le pigeon, XIII, 426; — dans la dysenterie, XIV, 813; — dans la cavité péritonéale, XI, 308; — dans une infection mortelle, XIV, 802.
Plasmolyse chez des bactéries, XI, 501.
Pneumonie pesteuse, XIII, 385.
Pneumobacille, XIV, 479.
Pneumocoque dans la maladie du sommeil, XIII, 193.
Poisons rénaux, XIV, 49.
Proenzymes, XII, 407.
Propylglycol, combustion biologique, XI, 600.
Protéolyse chez l'*aspergillus niger*, XIV, 60 et 420.
Pseudo-rage chez un malarique, XIV, 46.
Pseudo-tuberculose, XI, 909.
Putréfaction, XIII, 854.
Rage, XIV, III.
Rats (microbe pathogène pour les), XIV, 193.
Réflexes non nerveux (classification des), XV, 634.
Résorption des cellules, XII, 737.
Rhumatisme articulaire aigu, XI, 845.
Saccharification de l'amidon, XIII, 665, 757, 796.
Sang et bile des anguilles et des vipères, XI, 810.
Sarcine pathogène, XIII, 358.

Séborrhée grasse et pelade, XI, 134.
Septicémie des veaux, XI, 523.
Sérodiagnostic, XI, 1, 37, 670.
Sérothérapie de la septicémie gangréneuse, XV, 1; — de la fièvre jaune, XI, 753.
Sérum (action sporicide du), XII, 417; XV, 266.
Sorbose, production biochimique, XII, 385.
Spirillose des oies, XIII, 529.
Sérum antidiphtérique, XII, 696; — antihématique, XIV, 297; — anticoagulant, XV, 129; — antistreptococcique, XI, 177; — cytolytique, XV, 303; — hémolytique, XIV, 257 et 378; — néphrotoxique, XV, 17; — névrotoxique, XIV, 686; — préventif contre le rouget, XI, 481.
Sensibilisateurs des sérums, XV, 289.
Septicémies hémorrhagiques, XI, 342; XV, 734.
Spermotoxine et antispermotoxine, XIV, 1, 577; XV, 883.
Statistique de l'Institut Pasteur de Paris, XI, 336; XII, 301; XIII, 518; XIV, 437; XV, 445; — d'Alger, XIV, 190; — de l'Institut d'Athènes, XII, 404; — de l'Institut de Rio de Janeiro, XII, 541; — de la station de Tiflis, XI, 790.
Stérilisation des eaux par l'ozone, XIII, 344.
Streptothrix pathogène, XIII, 841.
Tétanos cérébral, XII, 225.
Têtards (action des microbes sur le développement des), XV, 630.
Tissus (étude chimique des), XV, 397.
Toxines et antitoxines du tube digestif, XIII, 435; — (constitution des), XIII, 581; — (influence de l'organisme sur les), X, 801; XI, 81, 163.
Toxines chimiques, XI, 161.
Toxine diphtérique, sa constitution, XIII, 568 et 801; XII, 26; — sur les muqueuses, XI, 210; — préparation, XII, 701.
Toxine tétanique, XIII, 464; XI, 591.
Tricocéphale dans l'appendice iléo-cœcal, XV, 440.
Tristeza, XV, 121.
Trypanosome des rats, XV, 673.
Trypsine et antitrypsine, XV, 737.
Tuberculose pisciaire, XIV, 535.
Tuberculose pulmonaire et tuberculose aviaire, XII, 561.
Tyrosinase, XV, 593; — dans un bacille pyocyanique, XV, 817.
Ulcère de l'Yemen, XI, 784.
Vaccin (action du sérum sanguin sur le), XIV, 102.
Vaccination (immunité dans la), XII, 837; et XIII, 82.

Vaccine expérimentale, XV, 161.

Vagin (purification spontanée), XV, 842.

Venins (immunisation contre les), XII, 214, 343; — altérations pathologiques qu'ils produisent, XII, 369; — des serpents, XII, 510.

Verruga du Pérou, XII, 591.

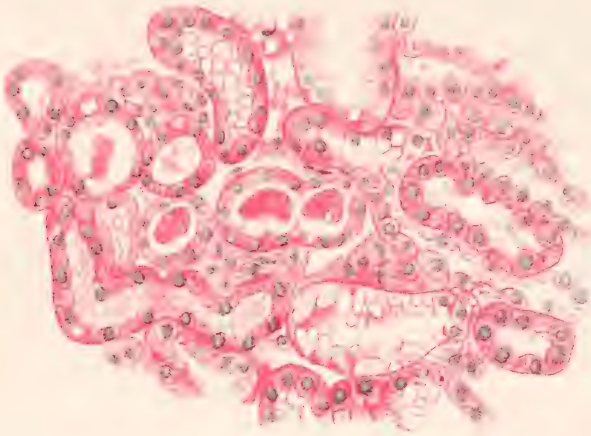
Vibrions dans l'organisme, XII, 273.

Virus rabique dans le cerveau, XIII, 513; — (action de la bile sur le), XIII, 506.

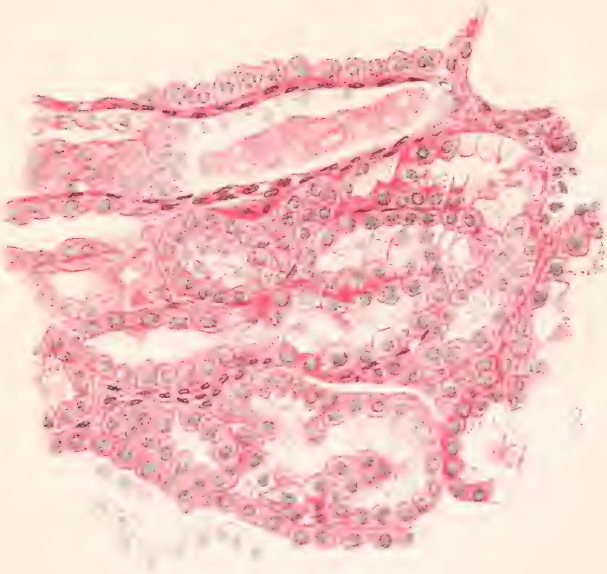
FIN

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

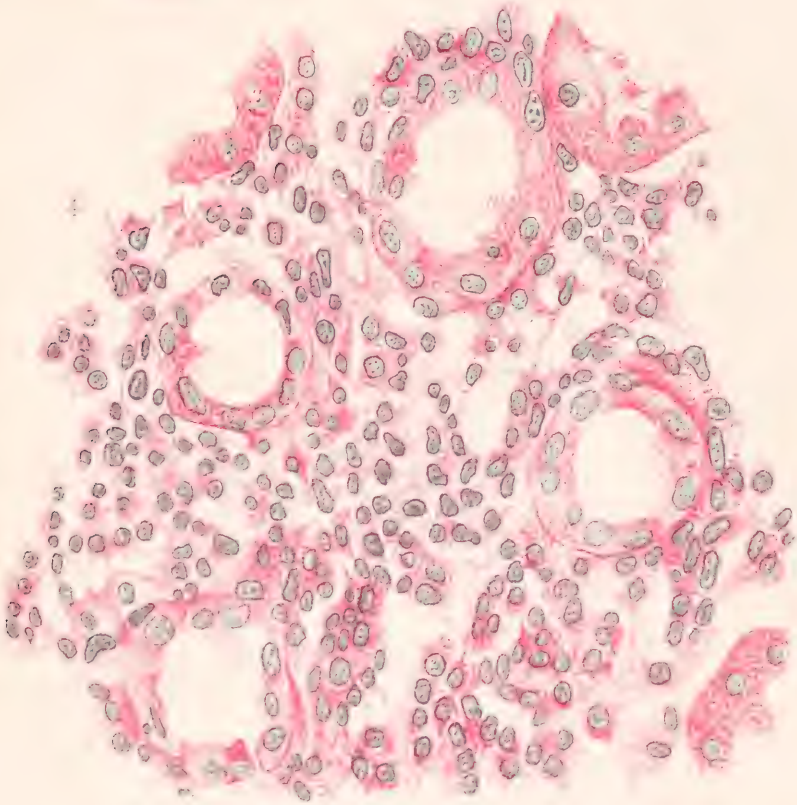


1



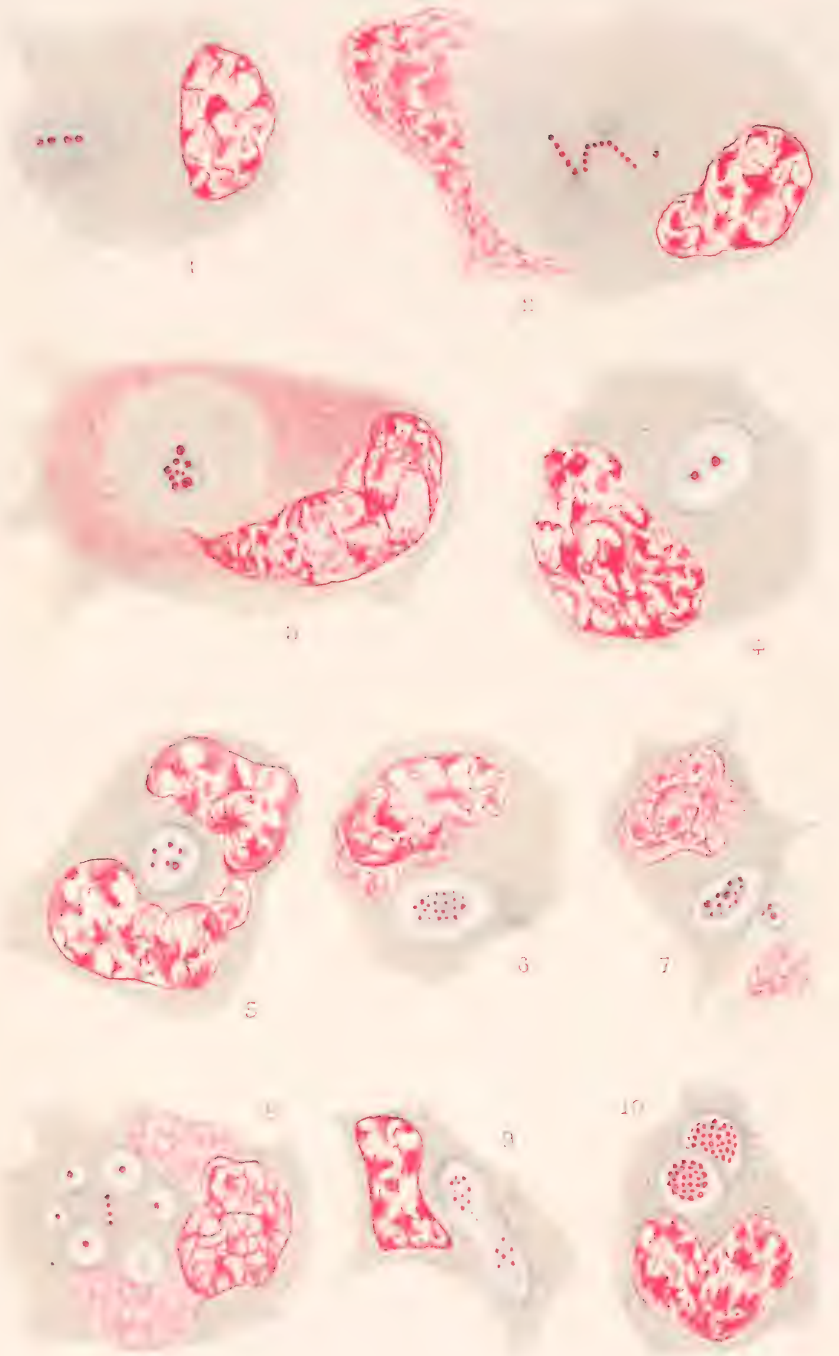
2

J. Roussel del. & lith. Imp. L. Lafontaine, Paris



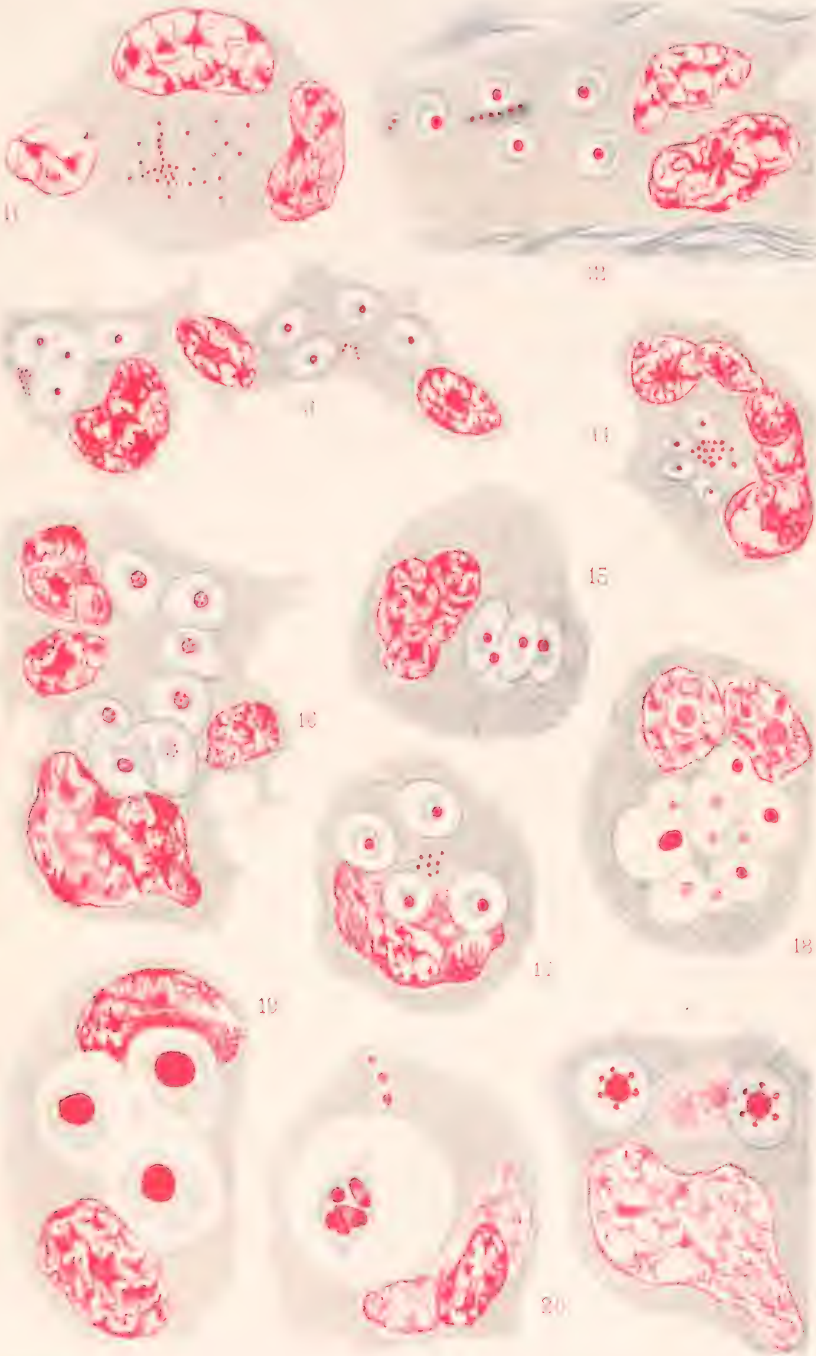
V. Roussel del. & lith. Imp. L. Lafontaine, Paris

V. Roussel, lith.



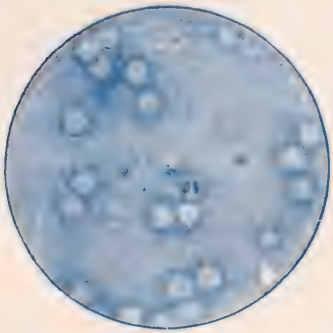
Dr Borrel, del. V. Roussel, lith.

Lafontaine, Paris

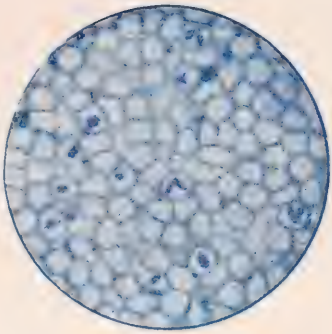


V. Roussel, lith.

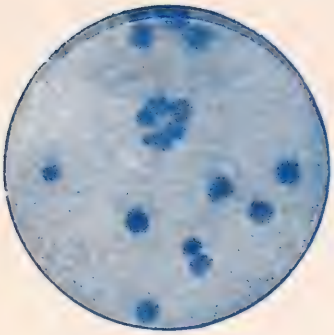
Imp. art. Lefontaine, Paris.



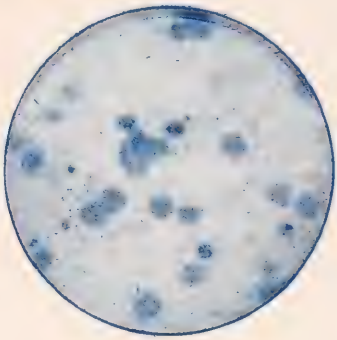
1



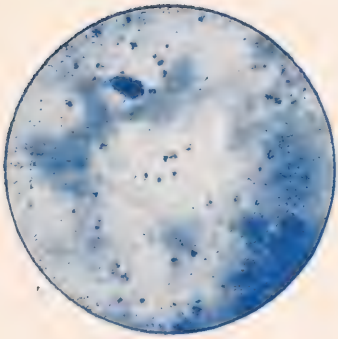
2



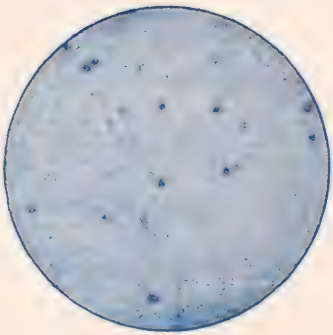
3



4



5

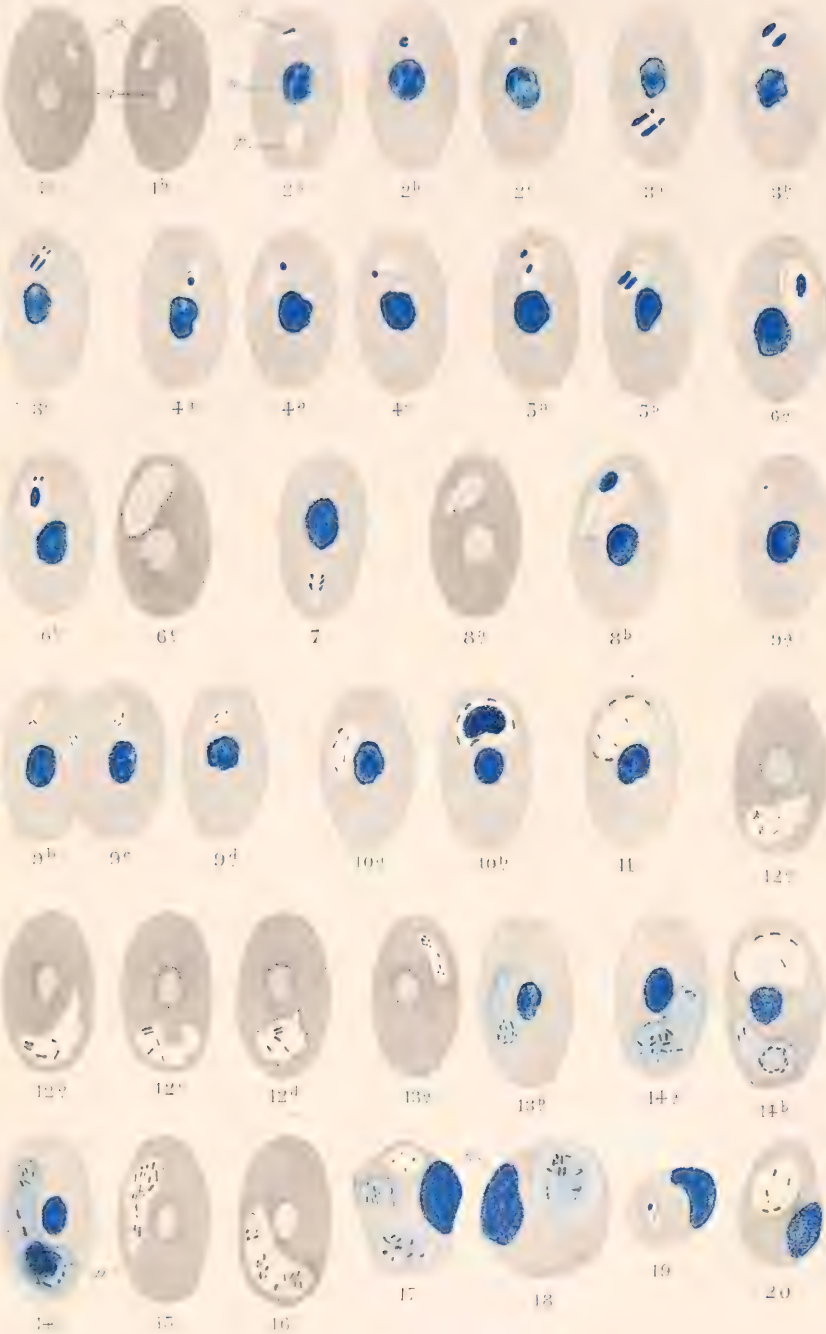


6

Dr P. L. Simond, del.

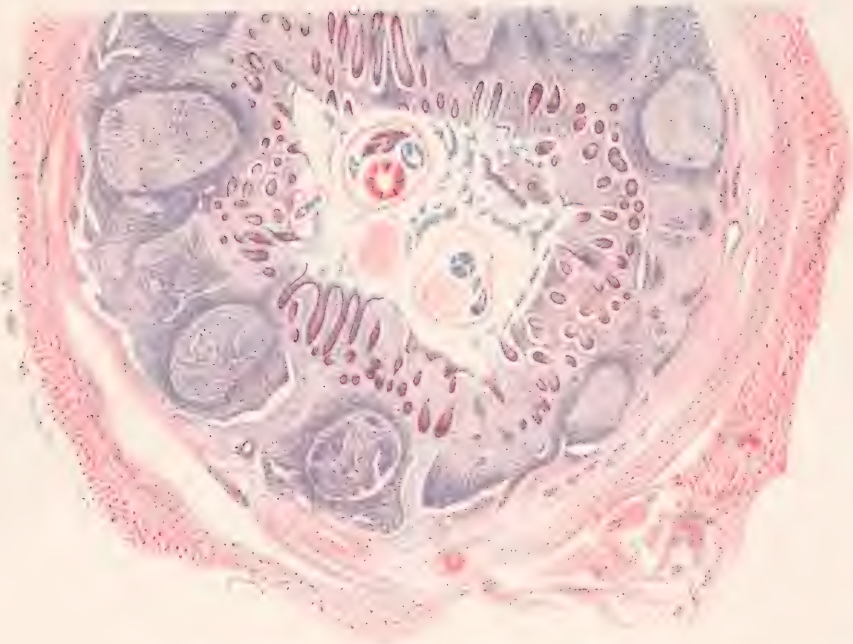
V. Roussel, lit.

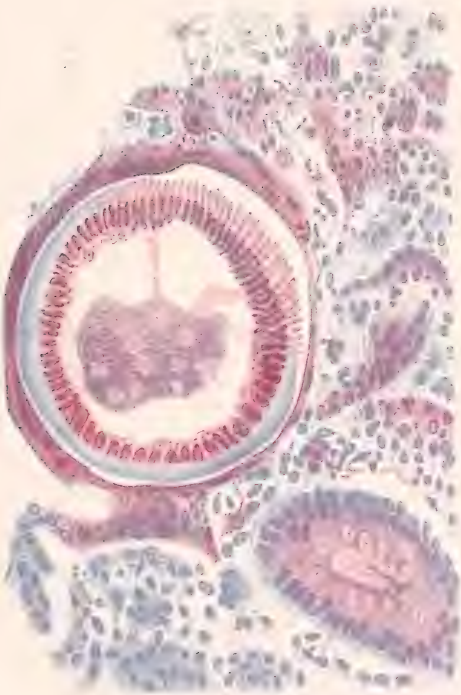
Imp. art. L. Lafontaine, Paris

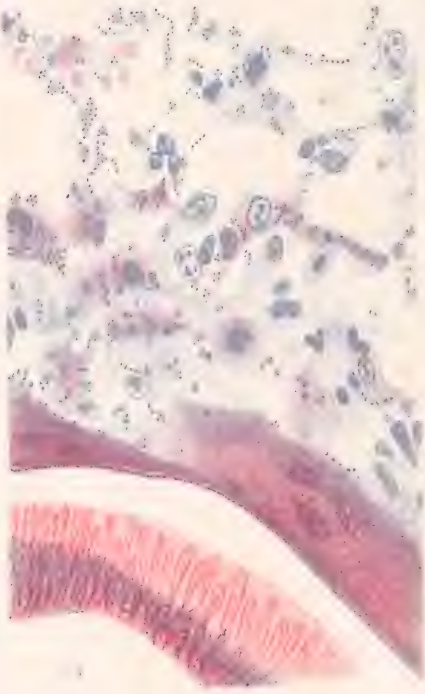


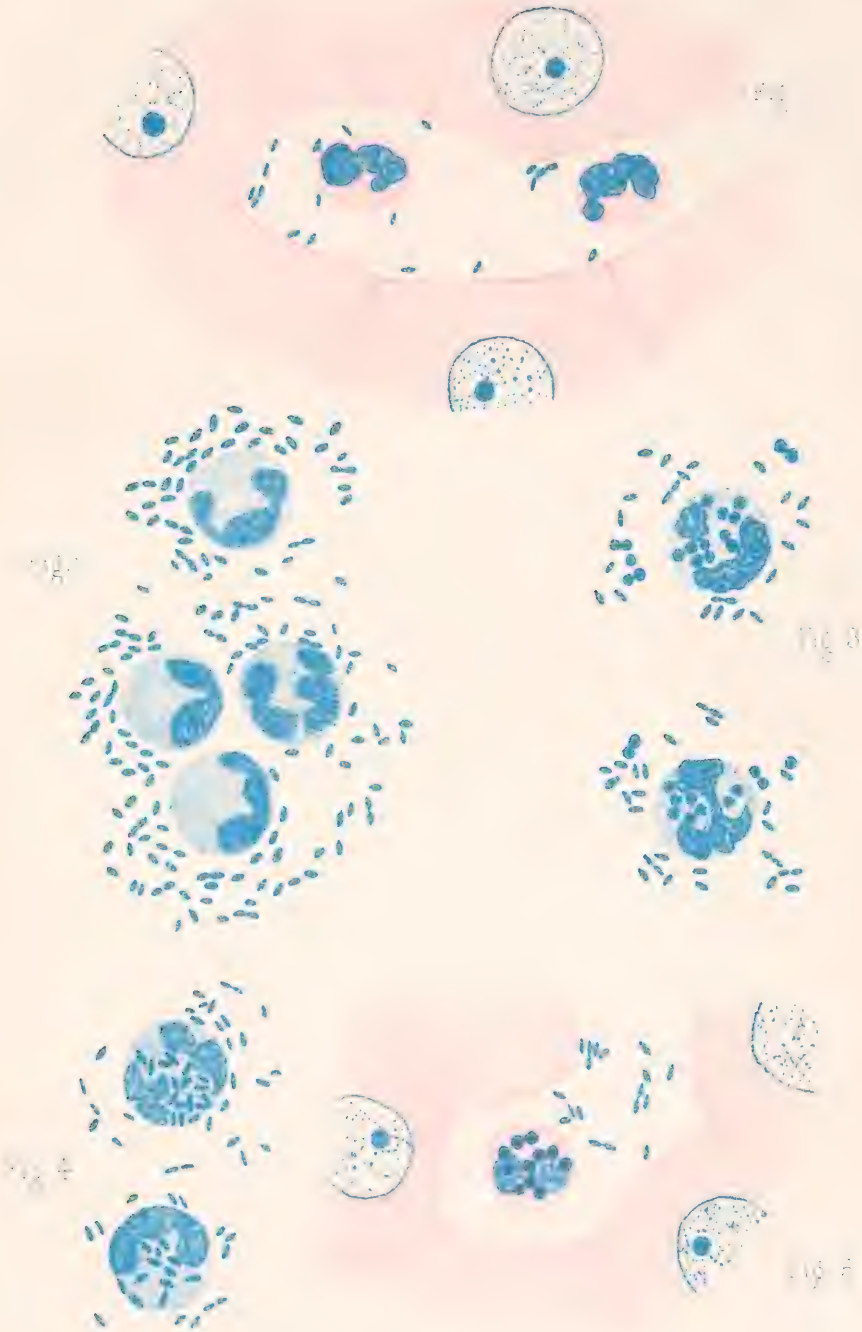
L. Simond del. V. Roussel lith.

Imp. art. L. Lafontaine, Paris.

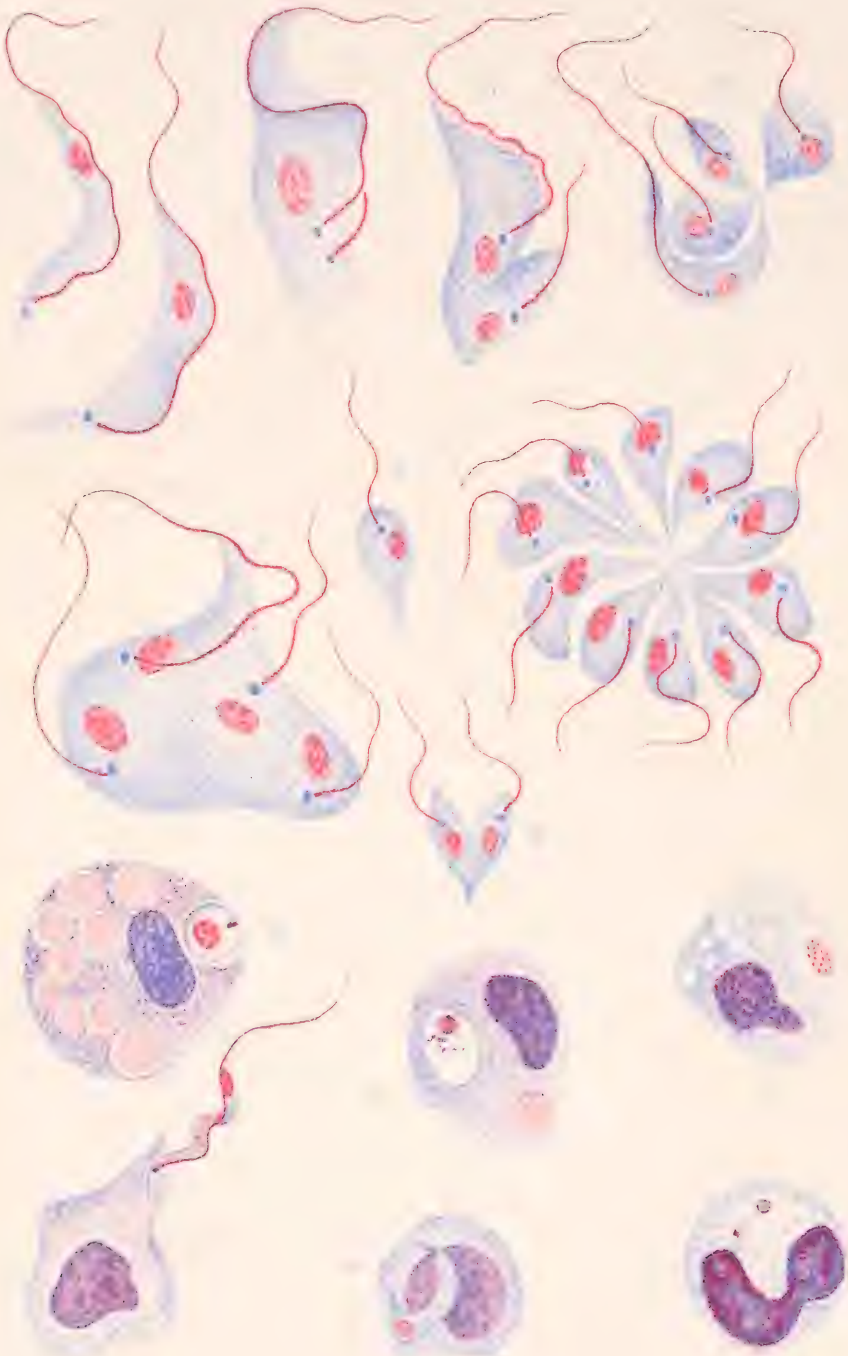






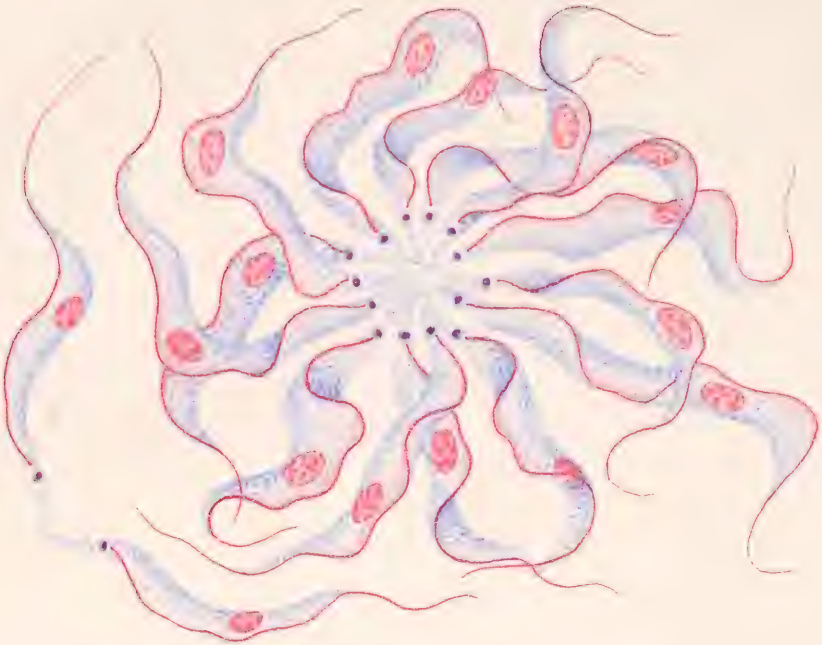


J. Roussel, lith. Imp. J. Lafontaine, Paris

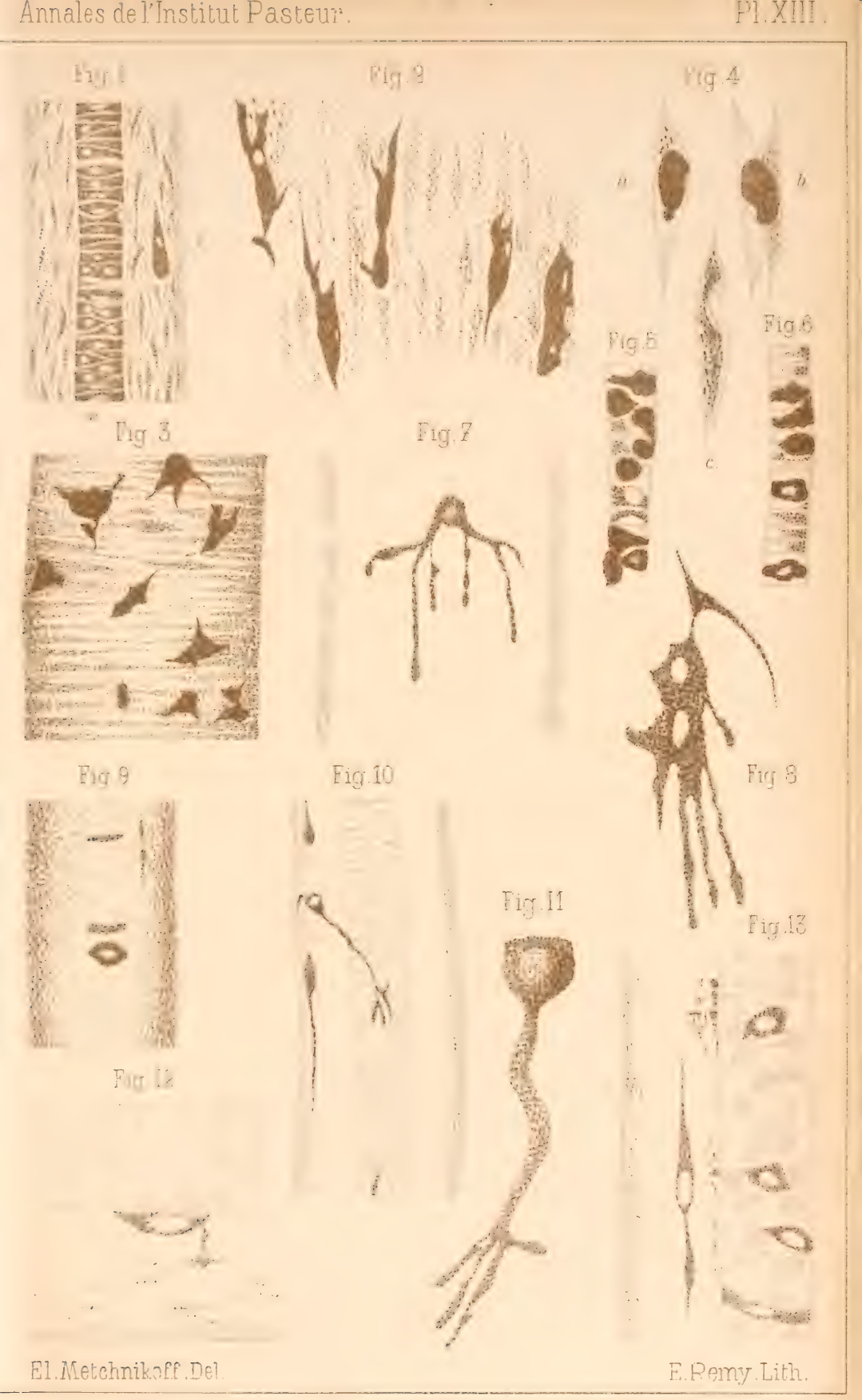


M. Gorsal del.

afontaine, Paris



Imp. J. Lafontaine, Paris



El. Metchnikoff. Del. E. Remy. Lith.

Imp. Lafontaine. Paris.

Fig. 16

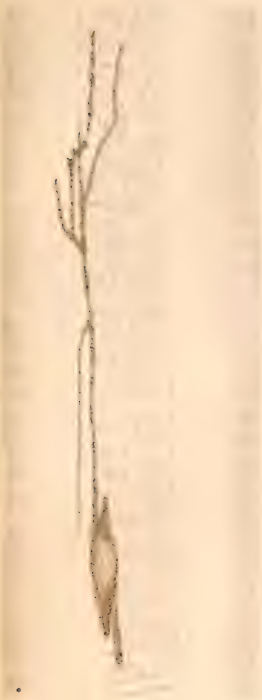


Fig. 14

Fig. 18

Fig. 19

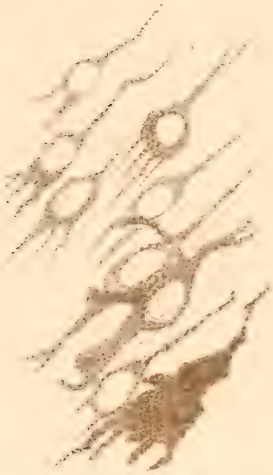


Fig. 17

Fig. 20

Fig. 15

El. Metchnikoff. Del. F. Remy. Lith.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

MM. Dr **CALMETTE** (A.), directeur de l'Institut Pasteur de Lille ;
CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur ;
Dr **GRANCHER**, professeur à la Faculté de médecine ;
METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur ;
NOCARD, professeur à l'École vétérinaire d'Alfort ;
Dr **ROUX**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
Dr **VAILLARD**, professeur au Val-de-Grâce.

TOME QUINZIÈME
1901
AVEC QUATORZE PLANCHES

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

A LA MÊME LIBRAIRIE

Traité de Microbiologie, par E. Duclaux, directeur de l'Institut Pasteur, professeur à la Sorbonne.

Tome I : **Microbiologie générale**, 1 vol. grand in-8°, avec figures. 15 fr.
Tome II : **Diastases, toxines et venins**, 1 vol. grand in-8°, avec fig. 15 fr.
Tome III : **Fermentation alcoolique**, 1 vol. grand in-8°, avec fig. 15 fr.
Tome IV : **Fermentations variées des diverses substances ternaires**, 1 vol. grand in-8° avec figures.

(L'ouvrage formera 7 volumes qui paraîtront successivement.)

Traité de Pathologie générale, par Ch. Bouchard, membre de l'Institut, professeur de pathologie générale à la Faculté de médecine de Paris. Secrétaire de la rédaction : G.-H. Roger, professeur agrégé à la Faculté de médecine, médecin des hôpitaux. 6 volumes grand in-8°, avec nombreuses figures dans le texte. Prix de la souscription..... 120 fr.

Leçons sur les maladies par ralentissement de la nutrition, professées à la Faculté de médecine de Paris, par Ch. Bouchard, membre de l'Institut. 3e édition. 1 volume grand in-8°..... 10 fr.

Précis de Microbie : *Technique et microbes pathogènes*, par le Dr L.-H. Thoinot, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux, et E.-J. Masselin, médecin-vétérinaire. Ouvrage couronné par la Faculté (*Prix Jeunesse*). *4e édition, revue et augmentée*, avec 210 figures, dont 20 en couleurs. 1 volume in-16 diamant, cartonné à l'anglaise, tranches rouges. 8 fr.

Précis de bactériologie clinique, par le Dr R. Wurtz, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux. *Deuxième édition*, revue et augmentée. 1 volume in-16 diamant, avec tableaux synoptiques et figures dans le texte, cartonné toile..... 6 fr.

Traité d'Hygiène, par A. Proust, professeur d'hygiène de la Faculté de médecine de Paris, membre de l'Académie de médecine, inspecteur général des Services sanitaires. *Troisième édition revue et considérablement augmentée*, avec la collaboration de A. Netter, professeur agrégé à la Faculté de médecine, membre du Comité consultatif d'hygiène publique de France, et H. Bourges, chef du laboratoire d'hygiène à la Faculté de médecine. 1 vol. in-8, avec figures et cartes dans le texte, publié en 2 fascicules. *En souscription*..... 18 fr.

Les Maladies infectieuses, par G.-H. Roger, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin des hôpitaux. 1 vol. in-8 de 1,520 pages, avec figures dans le texte, publié en 2 fascicules..... 28 fr.

L'Immunité dans les Maladies infectieuses, par Elie Metchnikoff, membre étranger de la Société royale de Londres, professeur à l'Institut Pasteur. 1 vol. in-12, avec 45 figures dans le texte..... 12 fr.

Traité élémentaire de Clinique thérapeutique, par le Dr Gaston Lyon, ancien chef de clinique à la Faculté de Médecine de Paris. *Quatrième édition, revue et augmentée*. 1 fort vol. grand in-8 de 1,540 pages, relié toile... 25 fr.

Maladies du cuir chevelu. — 1. Les Maladies séborrhéiques : *Séborrhée, Acnés, Calvitie*, par le Dr R. Sabouraud, chef du laboratoire de la Ville de Paris à l'hôpital Saint-Louis. 1 vol. in-8, avec 91 figures dans le texte, dont 40 aquarelles en couleurs..... 10 fr.

Sceaux. — Imp. E. Charaire.

MBL/WHOI LIBRARY
WH 195W A